

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM

**ESTRESSE OXIDATIVO E HIPOTERMIA
TERAPÊUTICA DURANTE A SÍNDROME PÓS-PARADA
CARDIORRESPIRATÓRIA**

Fernanda Schäfer Hackenhaar

Porto Alegre, Fevereiro de 2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM

**ESTRESSE OXIDATIVO E HIPOTERMIA
TERAPÊUTICA DURANTE A SÍNDROME PÓS-PARADA
CARDIORRESPIRATÓRIA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Aluna: Fernanda Schäfer Hackenhaar

Orientadora: Mara da Silveira Benfato

Porto Alegre, Fevereiro de 2016

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estresse Oxidativo do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em colaboração com o Hospital Nossa Senhora da Conceição e o Hospital de Clínicas de Porto Alegre-HCPA, em Porto Alegre-Brasil, com apoio da Fapergs/Capes e do FIPE-HCPA. Foi realizado um período de doutorado sanduíche no Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, em Milão-Itália, com apoio do programa Ciência Sem Fronteiras.

“Vês, lá longe, os campos de trigo? Eu não como pão. O trigo para mim não vale nada. Os campos de trigo não me lembram coisa alguma. E isso é triste! Mas tu tens cabelos dourados. Então será maravilhoso quando tiveres me cativado. O trigo, que é dourado, fará com que eu me lembre de ti. E eu amarei o barulho do vento no trigo...”

- Saint-Exupéry, Antoine de. Le petit prince, 1943.

E a ciência são os cabelos dourados para mim, nesses campos de trigo que são o mundo.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
Lista de abreviações.....	8
Fórmulas químicas	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Síndrome Pós-parada Cardiorrespiratória	10
1.2 Hipotermia Terapêutica.....	18
1.3 Estresse oxidativo e I/R pós-PCR.....	25
1.4 Fontes de espécies reativas na I/R pós-PCR.....	32
1.5 Dano aos tecidos e alterações metabólicas pós-I/R	35
1.6 Influência da hipotermia terapêutica na I/R pós-PCR e estresse oxidativo	39
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVO GERAL.....	44
3.1 Objetivos específicos	45
4. CAPÍTULO I.....	47
5. CAPÍTULO II.....	76
5.1. Resultados suplementares	98
6. DISCUSSÃO	102
7. CONCLUSÕES	111
8. PERSPECTIVAS	114
9. ANEXOS	115
10. REFERÊNCIAS	119
11. CURRICULUM VITAE.....	134

RESUMO

A **síndrome pós-parada cardiorrespiratória** é o estado fisiopatológico pós-reanimação em pacientes que sofreram parada cardíaca, consequente do estresse oxidativo gerado pela isquemia-reperusão. A hipotermia terapêutica leve pode reduzir o dano aos tecidos sofrido pelos pacientes pós-parada. Porém, os mecanismos pelos quais a hipotermia pode reduzir estes danos ainda precisam ser elucidados. Este estudo foi realizado em duas partes. **Síndrome pós-parada cardiorrespiratória em modelo animal:** 26 ratos sofreram 6 min de parada cardíaca em fibrilação ventricular e foram depois reanimados. Os animais reanimados foram eutanasiados 2, 4 e 72-h pós-parada, e comparados ao grupo controle. O volume de ejeção do ventrículo esquerdo foi reduzido 2 e 4 h pós-reanimação, e recuperado após 72 h. Os níveis de troponina-T cardíaca altamente sensível, isoprostanos e 8-hidroxi-guanosina no tecido miocárdico aumentaram 2 e 4 h pós-reanimação, e foram recuperados após 72 h. No miocárdio, isoprostanos estão correlacionados positivamente aos níveis de troponina-T e inversamente com o volume de ejeção do ventrículo esquerdo. Os níveis de 8-hidroxi-guanosina no miocárdio também estão correlacionados positivamente aos níveis de troponina-T e inversamente ao volume de ejeção do ventrículo esquerdo. Os resultados evidenciam que a peroxidação e o dano oxidativo ao DNA no tecido miocárdico podem estar relacionados ao dano e à disfunção do miocárdio durante as primeiras horas pós-parada cardíaca. **Hipotermia terapêutica em pacientes durante a síndrome pós-parada cardiorrespiratória:** Foram incluídos pacientes vítimas de parada cardíaca intra- e extra-hospitalar, internados em unidade de terapia intensiva de 2011 e 2012, para receber o tratamento padrão (n= 31) ou hipotermia terapêutica (n= 11). A hipotermia leve (32-34°C) foi induzida 4-5 h pós-reanimação durante 24 h. Dados clínicos e amostras de sangue venoso foram coletadas 6, 12, 36 e 72 h pós-parada. Os níveis séricos de malondialdeído (marcador de peroxidação lipídica), e os níveis de grupos carbonila (marcador de oxidativo em proteínas) no plasma, foram significativamente reduzidos pela hipotermia terapêutica. A atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona-S-transferase está significativamente aumentada em eritrócitos no grupo hipotérmico. A atividade da paraoxonase está diminuída no soro de pacientes tratados com hipotermia. A atividade da enzima geradora do radical ânion superóxido xantina oxidase está diminuída 36 e 72 h pós-parada no grupo hipotérmico. Os dados mostram que a hipotermia reduz significativamente o dano oxidativo pós-parada cardiorrespiratória e, ao menos em parte, restaurou a redução das defesas antioxidantes durante a síndrome pós-parada cardiorrespiratória.

ABSTRACT

The **post-cardiac resuscitation syndrome** is a pathophysiologic state after the successful cardiopulmonary resuscitation in cardiac arrest patients, consequent of oxidative stress after ischemia-reperfusion. The mild hypothermia treatment may improve the tissue damage in post-cardiac arrest patients. The mechanisms involving cardiac arrest pathophysiology and hypothermia treatment are not well elucidated. The study presents two parts. **Post-cardiac resuscitation syndrome in animal model:** Untreated ventricular fibrillation for 6 min was induced in 26 rats followed by cardiopulmonary resuscitation. Resuscitated animals were sacrificed at 2, 4 and 72 h, and were compared to a control group. Left ventricular ejection fraction was reduced at 2 and 4 h following resuscitation, while it was similar at 72 h. Inversely, high sensitivity cardiac troponin T, isoprostanes and 8-hydroxyguanosine levels increased at 2 and 4 h post-resuscitation, while returned to baseline 72 h later. Myocardial isoprostanes were directly related to high sensitivity cardiac troponin T levels and inversely related to left ventricular ejection fraction. Myocardial 8-hydroxyguanosine, biomarker of DNA damage, were also directly related to high sensitivity cardiac troponin T levels and inversely related to left ventricular ejection fraction. The results provide evidence that lipid peroxidation and DNA oxidative damage in myocardial tissue are closely related to myocardial injury and dysfunction during the initial hours following cardiac arrest. **Hypothermia treatment for post-cardiac resuscitation syndrome patients:** Intensive care unit patients admitted in 2011 and 2012, victims of in-hospital or out-of-hospital cardiac arrest were screened for the study. Patients were assigned for standard care (n= 31) or therapeutic hypothermia (n= 11). Mild hypothermia (32-34°C) was induced 4-5h after successful cardiopulmonary resuscitation for 24 h. Clinical data and venous blood samples were collected 6, 12, 36 and 72 h post-cardiac arrest. Serum malondialdehyde levels (lipid peroxidation biomarker) and plasma carbonyl levels (oxidative protein damage biomarker) were decreased in hypothermic group at all time-points. The enzymatic antioxidant activities of superoxide dismutase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase were increased in the hypothermic group at all time-points. Differently, the paraoxonase activity, a high-density lipoproteins antioxidant enzyme, was decreased in hypothermic group. Presented data show hypothermia treatment decreased oxidative damage and, at least in part, reduced the impairment of antioxidant defenses during post-cardiac resuscitation syndrome.

Lista de abreviações:

ATP, adenosina trifosfato.
COX-2, ciclooxigenase-2.
CuZnSOD, superóxido dismutase citoplasmática.
DNA, ácido desoxirribonucleico.
EC-SOD, superóxido dismutase extracelular.
eNOS, óxido nítrico sintase endotelial.
EROs, espécies reativas de oxigênio.
ERNs, espécies reativas de nitrogênio.
GPx, glutathiona peroxidase.
GR, glutathiona redutase.
GSH, glutathiona reduzida.
GSSG, glutathiona oxidada.
GST, glutathiona-S-transferase.
hs-cTnT, troponina-T cardíaca altamente sensível.
IL-1 β , interleucina-1 β .
IL-6, interleucina-6.
I/R, isquemia-reperfusão.
LOOH, peróxido lipídico.
MDA, malondialdeído.
MnSOD, manganês superóxido dismutase.
mRNA, ácido ribonucleico mensageiro.
NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleotídeo.
NOS, óxido nítrico sintase.
NSE, enolase neurônio-específica.
PCR, parada cardiorrespiratória.
PON, paraoxonase.
ROOH, peróxidos.
ROSC, retorno da circulação espontânea.
S100B, proteínas séricas S100B.
SOD, superóxido dismutase.
SPCR, síndrome pós-parada cardiorrespiratória.
TRX, tioredoxina.
TNF- α , fator- α de necrose tumoral.

UTI, unidades de terapia intensiva.

XDH, xantina desidrogenase.

XDR, xantina oxidorreductase.

XO, xantina oxidase.

Fórmulas químicas:

Ar, argônio.

Ca⁺⁺, cálcio.

Cu⁺⁺, cobre.

Fe⁺⁺, ferro.

H₂, hidrogênio.

H₂O, água.

H₂O₂, peróxido de hidrogênio.

Mg⁺⁺, magnésio.

N₂, nitrogênio.

•NO, óxido nítrico.

O₂, oxigênio.

O₂^{•-}, superóxido.

O₃, ozônio.

ONOO⁻, peroxinitrito.

Estresse oxidativo e hipotermia terapêutica durante a síndrome pós-parada cardiorrespiratória

1. INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome pós-parada cardiorrespiratória

A **parada cardiorrespiratória (PCR)** é uma emergência médica definida como a parada abrupta da ventilação e circulação sanguínea espontâneas, prontamente reconhecida pela ausência de pulsos palpáveis, ausência de movimentos respiratórios efetivos e falta de resposta a estímulos (American Heart Association, 2005). A PCR é responsável por cerca de 330 mil **óbitos** dentro e fora de hospitais e departamentos de emergência anualmente nos Estados Unidos (Nolan *et al.*, 2008). A **taxa de mortalidade** pós-PCR é semelhante em diversos países. Segundo dados da *Canadian Critical Research Network*, a taxa de mortalidade hospitalar foi de 65% em 1.483 pacientes pós-PCR internados em unidades de terapia intensiva (UTI) (Keenan *et al.*, 2007). Um estudo policêntrico realizado em 2006, o *National registry of cardiopulmonary resuscitation-NRCPR*, calculou uma taxa de mortalidade hospitalar de 67% dos 19.189 pacientes adultos vítimas de PCR (Nadkarni *et al.*, 2006). No Reino Unido, a taxa de mortalidade avaliada foi de 71,4% em 8.987 pacientes pós-PCR internados em UTI, chegando ao óbito antes de receber alta hospitalar (Nolan *et al.*, 2008). É importante ressaltar que, em geral, a taxa de sobrevivência intra-hospitalar pós-PCR, que pode variar de 13 a 37%, é muito menor que a taxa calculada para o total de paradas cardíacas, avaliada em cerca de 90%. Isso se deve ao estado de gravidade dos pacientes internados em UTI (Kazaure, Roman e Sosa, 2013). Além disso, de 25 a 67% dos óbitos intra-hospitalares ocorrem dentro das primeiras 24 h de internação (Sandroni *et al.*, 2004). Após a alta hospitalar ainda existe uma importante taxa de óbitos, apesar de menor que em pacientes internados. Por exemplo, em um estudo envolvendo 245

pacientes com idade média de 70 anos, do total de pacientes que receberam alta, 17,2% ainda estavam vivos após 32 meses (Di Bari *et al.*, 2000).

No Brasil existem poucos dados epidemiológicos, porém o número de mortes em 2012 foi avaliado em 273.000 mortes/ano, uma média de 748 casos por dia (Negovsky, 2012). Avaliando-se o número total de pacientes internados em diversas UTI nos Estados Unidos por um período de 10 anos, constatou-se que a frequência de PCR no ano de 2000 era de 1:453, subindo gradativamente a cada ano para 1:339 até 2009, representando um aumento de 33,7%. Apesar disso, a sobrevivências dos pacientes passou de 20,6% para 26,8% no mesmo período. É possível que parte do aumento no número de PCR ocorreu devido a crescente prevalência de doenças cardiovasculares na população estudada. Interessantemente, os pacientes mais recentes, de 2009, são mais jovens e com menor renda quando comparados à população no início do estudo, em 2000 (Kazaure, Roman e Sosa, 2013).

Existe grande dificuldade em calcular o **custo da PCR** para o sistema de saúde, já que este custo pode variar de acordo com a localização do paciente no momento da parada (extra- ou intra-hospitalar), o tempo de internação e de coma do paciente, a gravidade do quadro, necessidade de tratamento para complicações pulmonares, sepse e outras comorbidades, necessidade de intervenção cirúrgica, etc. Um dos poucos estudos recentes concluiu que pacientes que tiveram PCR extra-hospitalar internados em UTI no Reino Unido por um total de 696 dias, custaram £17.000/paciente (68 pacientes foram internados neste período), cerca de R\$100.000 por paciente (Petrie *et al.*, 2015). Em um estudo multicêntrico nos Estados Unidos, o custo das hospitalizações de pacientes pós-PCR foi calculado por um período de 10 anos. Um total de \$ 19,9 bilhões de dólares foram gastos nos mais de 300 milhões de pacientes internados no período, e 63% deste valor foi gasto no tratamento de pacientes que tiveram óbito durante a hospitalização. Porém, o custo

médio da internação dos pacientes sobreviventes foi significativamente maior (\$28.917) em relação aos não sobreviventes (\$13.229), assim como os custos diários das internações, avaliados em \$3.774 e \$3.053, respectivamente (Kazaure, Roman e Sosa, 2013).

A PCR pode ser classificada de acordo com o ambiente da ocorrência: extra- ou intra hospitalar, mas também de acordo com o ritmo cardíaco da parada cardíaca. Existem quatro **ritmos que levam à parada cardíaca sem pulso**: fibrilação ventricular (VF), taquicardia ventricular (VT), atividade elétrica sem pulso (PEA) e assistolia. A determinação do ritmo de parada é de extrema relevância para se determinar o manejo dos pacientes, e assim aumentar as chances de sucesso na reanimação cardiopulmonar (American Heart Association, 2005).

A maioria dos estudos considera que a reanimação do paciente pós-PCR é bem-sucedida quando a circulação se mantém por >20min, e é denominada **retorno da circulação espontânea (ROSC, do inglês *return of spontaneous circulation*)** (Nolan *et al.*, 2008). Atualmente, os protocolos de reanimação cardiopulmonar estão bem estabelecidos, porém é importante ressaltar que a reanimação do paciente pode ocorrer de diferentes maneiras dependendo da situação em que ocorreu, por exemplo, se foi extra- ou intra-hospitalar, ou se o paciente foi primeiramente atendido por leigos ou pela equipe hospitalar. A utilização da suflação e massagem cardíaca por compressão manual torácica é essencial para o atendimento em paradas extra-hospitalares, e o treinamento da população para sua utilização é de interesse público. No ambiente intra-hospitalar o protocolo de reanimação pode envolver o uso de desfibrilador, manobra manual de massagem cardíaca, massagador cardíaco mecânico, massagem cardíaca de peito fechado ou aberto, massagem cardíaca direta e desfibrilação direta, administração de adrenalina e vasopressores, dentre outras opções.

As manobras de **reanimação pós-PCR** começaram a apresentar importante sucesso na metade do século XX. Por esse motivo, em 1953 Stephenson e colaboradores puderam descrever pela primeira vez a existência da alta mortalidade após o retorno do batimento cardíaco dos pacientes (Stephenson, Reid e Hinton, 1953). No início dos anos 70, Negovsky e colaboradores reconheceram que a reanimação dos pacientes levava a um conjunto bem definido de características patológicas que não estavam presentes nos pacientes antes da reanimação. Esta síndrome é hoje chamada de **síndrome pós-parada cardiorrespiratória (SPCR)**, definida como o estado fisiopatológico pós-ROSC, que surge devido ao processo de isquemia-reperfusão (I/R) generalizado. As principais patologias consequentes da I/R durante a SPCR são: **lesão cerebral**, que pode gerar desde convulsões até disfunções cognitivas, coma, estado vegetativo persistente ou morte cerebral; **disfunção do miocárdio**, gerando uma evidente redução do débito cardíaco, arritmias e até mesmo podendo levar ao colapso cardiovascular; e **resposta sistêmica a I/R**, incluindo hipoxia, isquemia, hipotensão, febre, hiperglicemia, suscetibilidade a infecções e evidente inflamação sistêmica (Nolan *et al.*, 2008; Negovsky, 2012).

De acordo com a evolução do estudo da fisiopatologia da SPCR, foi possível dividi-la em **fases** pós-reanimação:

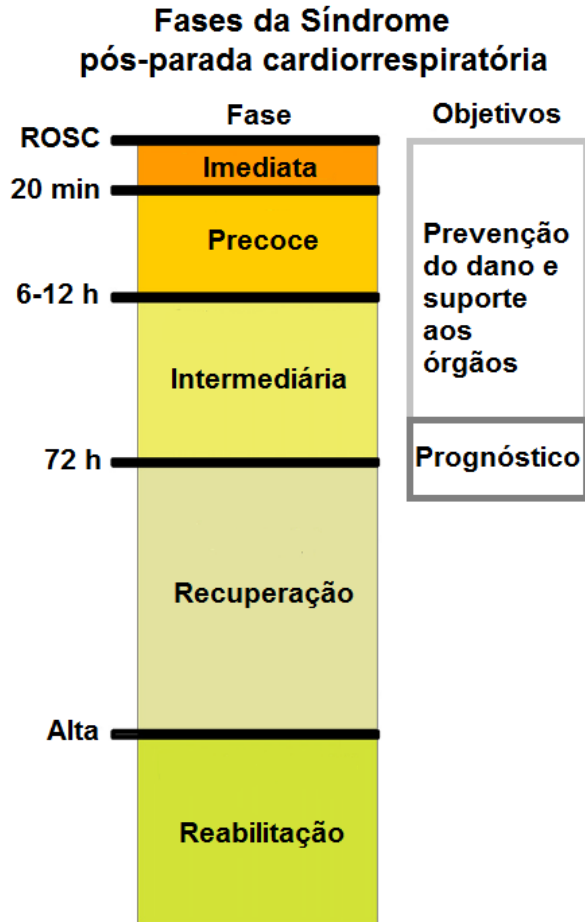


Fig. 1. Fases da síndrome pós-parada cardiorrespiratória. ROSC, retorno da circulação espontânea.

Modificado de Nolan et al., 2008.

A **fase imediata**, que é definida como os primeiros 20 min pós-reanimação; a **fase precoce**, entre 20 min e 12 h pós-reanimação, onde intervenções são mais eficazes; a **fase intermediária**, entre 12 e 72 h pós-reanimação, quando as vias de dano aos tecidos ainda estão ativas e um tratamento mais agressivo geralmente é aplicado; e a **fase tardia**, após 72 h da reanimação, quando o prognóstico do paciente torna-se confiável (Nolan *et al.*, 2008). Após a reanimação, o paciente é considerado tecnicamente vivo, porém o índice de mortalidade é alto durante todas as fases da SPCR, com uma mediana de 1,5 dias.

Importantemente, pacientes rapidamente reanimados não apresentam SPCR. Assim, é evidente que quando maior o **tempo levado para a reanimação**, atingindo o ROSC,

maior o dano aos tecidos. Corroborando esta ideia, o *National registry of cardiopulmonary resuscitation* avaliou diferentes tempos de reanimação pós-PCR, demonstrando que 62% dos 17.183 adultos que tiveram reanimação com um tempo de 20 min ou mais para atingir o ROSC não sobreviveu à internação hospitalar (Nadkarni *et al.*, 2006). O tecido mais rapidamente atingido pela I/R, e também de maior importância na recuperação do paciente, é o tecido cerebral (Laver *et al.*, 2004).

A **lesão cerebral pós-PCR** é a principal causa de mortalidade e morbidade em pacientes durante a SPCR. Em um estudo com pacientes que sobreviveram à internação na UTI, mas que posteriormente morreram no hospital, a lesão cerebral foi causa de morte em 68% dos pacientes vítimas de PCR extra-hospitalar e em 23% dos pacientes vítimas de PCR intra-hospitalar (Kliegel *et al.*, 2004). Dos pacientes sobreviventes, 10 a 40% permanecem com danos cerebrais significativos (Safar, 1988). Também, sabe-se que 80% dos pacientes que atingiram o ROSC permanecem inconscientes por variáveis períodos de tempo e 20% deles evoluem para um estado de coma (Mori *et al.*, 2000) devido à limitada tolerância do cérebro a I/R. Ainda, estudos têm reportado que mesmo após manter o ROSC de forma estável em pacientes internados, de 8 a 16% apresentam morte cerebral (Nolan *et al.*, 2008). Os mecanismos que levam à lesão cerebral pela SPCR incluem excitotoxicidade, alteração na homeostase do cálcio (Ca^{++}), formação de radicais livres, disfunção mitocondrial, ativação de proteases, alteração na expressão de genes e ativação de vias de sinalização relacionadas à morte celular. Muitos desses mecanismos ocorrem **horas ou até 3 dias após o retorno da circulação espontânea** (Neumar, 2000). Por este motivo o desenvolvimento de novos tratamentos para SPCR deve visar principalmente as primeiras 72 h pós-ROSC.

A **disfunção do miocárdio** pós-PCR também contribui para mortalidade dos indivíduos durante a SPCR (Neumar, 2000). A disfunção é caracterizada pela falha

mecânica do miocárdio que persiste depois da reperfusão, apesar da aparente ausência de danos irreversíveis e da restauração do fluxo coronariano normal ou quase normal (Bolli, 1998). Apesar da grande instabilidade hemodinâmica e de variações individuais nos primeiros minutos pós-PCR, algumas características da instabilidade hemodinâmica são evidentes durante SPCR, como a redução da fração de ejeção, redução do débito cardíaco e hipotensão (pressão arterial média inferior a 75 mmHg) (Nolan *et al.*, 2008). Interessantemente, tanto estudos em modelos experimentais como estudos pré-clínicos e clínicos indicam que esta disfunção é transiente e pode ser completamente revertida naturalmente em danos mais leves, ou através de tratamento em danos mais graves (Ruiz-Bailen *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2012).

O **dano aos órgãos e tecidos pós-I/R** é consequente do dano oxidativo, da inflamação generalizada, da ativação de cascatas de coagulação e de ativação das vias de morte celular, que contribuem para a falha múltipla de órgãos que pode ocorrer durante a SPCR. Além disso, a própria instabilidade hemodinâmica contribui para a falha múltipla dos órgãos (Neumar, 2000). A proporção em que as vias de necrose e apoptose contribuem para os danos aos tecidos pós-PCR ainda é discutida, porém sabe-se que cada via de morte celular é mais frequente dependendo do tecido e até mesmo do tipo celular, além de depender do tempo de isquemia. Técnicas testadas com o intuito de melhorar a oxigenação cerebral durante a reperfusão pós-reanimação apontam para o estresse oxidativo como um importante fator que contribui para a morte celular neste tecido. Comparando-se a utilização de 100% ou 21% de oxigênio (O₂) na ventilação mecânica durante a reperfusão pós-PCR, existe aumento de marcadores de dano oxidativo e de dano neuronal (Vereczki *et al.*, 2006; Richards *et al.*, 2007), podendo afetar outros tecidos de forma semelhante.

Ainda, o paciente pode apresentar a **patologia que o levou à PCR** conjuntamente com a SPCR, agravando ainda mais seu quadro clínico (Sterz *et al.*, 1991; Nolan *et al.*,

2008). Hoje, as doenças cardiovasculares, pulmonares e tromboembólicas são as que mais levam pacientes à parada cardíaca. A doença arterial coronariana está presente na maioria dos pacientes que sofrem PCR extra-hospitalar. De acordo com esta perspectiva, o infarto agudo do miocárdio é a causa mais comum de morte súbita de origem cardíaca e está presente em aproximadamente 50% dos pacientes vítimas de PCR reanimados (Bulut *et al.*, 2000). Dentre as principais causas de parada cardíaca em pacientes intra- ou extra-hospitalares atendidos em UTI, podemos incluir: doenças cardiovasculares, como síndromes coronarianas agudas e infarto agudo do miocárdio; doenças pulmonares, como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica; acidentes vasculares cerebrais; doenças tromboembólicas como embolia pulmonar; overdoses e envenenamentos; doenças infecciosas como sepse e pneumonia; e hipovolemias causadas por hemorragia ou desidratação (Nolan *et al.*, 2008). Além disso, essas doenças podem se agravar após o ROSC (Ornato *et al.*, 1985), tornando essencial a identificação e imediato tratamento da causa que levou o paciente a PCR.

Atualmente, grande parte do **tratamento do paciente** durante a SPCR é baseado no tratamento individual das patologias que o levaram à parada e, quanto mais rapidamente a intervenção for iniciada, melhor o desfecho clínico. Outros cuidados são considerados protocolo-padrão no tratamento do paciente pós-PCR e melhoram o seu quadro clínico. Esses cuidados incluem: a reanimação do paciente; controle da sepse através de antibióticos; o controle hemodinâmico e da ventilação, com foco no controle da pressão e da reoxigenação sanguínea; o controle da glicemia e da temperatura corporal, principalmente evitando a hipertermia (Oddo *et al.*, 2006; Nolan *et al.*, 2008), dentre outras intervenções. Além disso, os pacientes são mantidos sob um sistema de reperfusão controlada. Este tratamento tem como objetivo reduzir os danos causados pela I/R, e tem melhorado o prognóstico desses pacientes (Beyersdorf, 2009). O controle da piroxia (ou

febre) é considerado de fundamental importância para o desfecho clínico de pacientes durante a SPCR. Durante as primeiras 72 h pós-ROSC o risco de morte cerebral aumenta consideravelmente em pacientes com temperatura corporal acima de 39 °C. Além disso, a cada grau acima de 37 °C o desfecho clínico dos pacientes piora (Zeiner *et al.*, 2001; Nolan *et al.*, 2008). Importaneamente, o uso terapêutico de hipotermia induzida tem melhorado o prognóstico de pacientes pós-PCR.

1.2 Hipotermia terapêutica

A **hipotermia terapêutica** tem sido recomendada como tratamento para SPCR a partir de 2002, devido à publicação de dois importantes estudos prospectivos, controlados e randomizados sobre o tratamento na revista *The New England Journal of Medicine*. Nestes estudos, a sobrevivência e o quadro neurológico dos pacientes apresentaram melhora significativa com o tratamento em hipotermia (32°-34 °C) durante 12 h (Bernard *et al.*, 2002) e 24 h (Holzer *et al.*, 2002) quando comparados a pacientes normotérmicos.

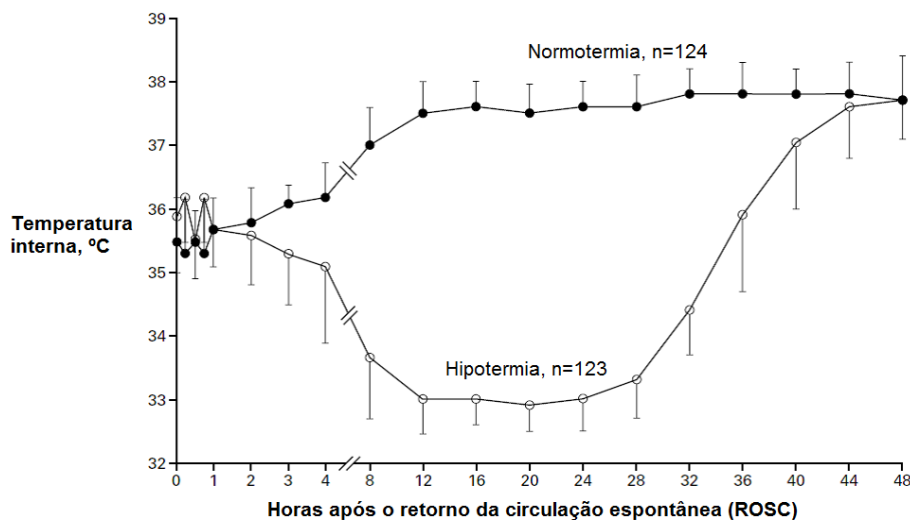


Fig. 2. Temperatura da bexiga em pacientes normotérmicos vs. hipotérmicos pós-parada cardíaca. Modificado de Holzer *et al.*, 2002.

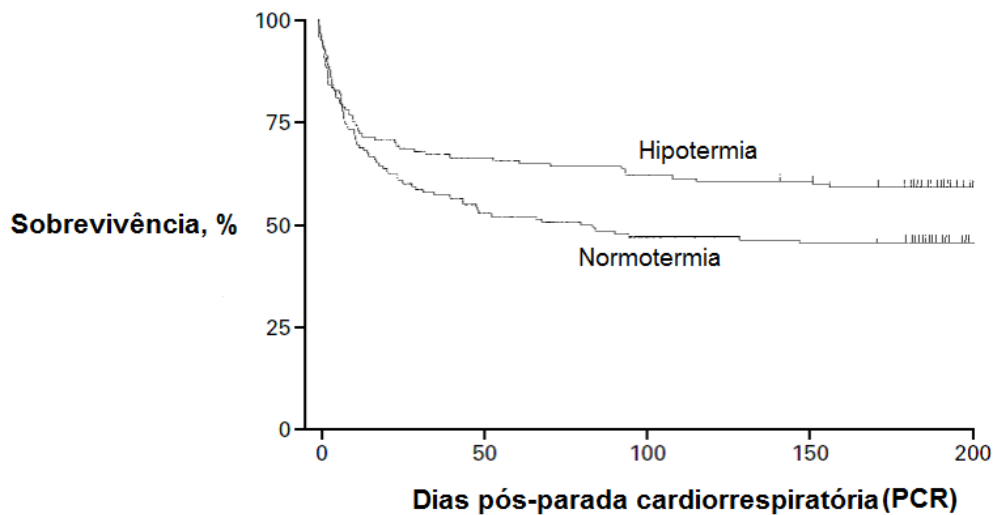


Fig. 3. Sobrevivência em 200 dias de pacientes normotérmicos vs. hipotérmicos pós-parada cardíaca. Modificado de Holzer et al., 2002.

O estudo da hipotermia terapêutica em pacientes foi realizado em 273 indivíduos de 9 hospitais europeus, com pacientes que sofreram PCR em fibrilação ventricular. O protocolo de hipotermia teve duração de 24 h, seguido de fase de reaquecimento de 12 h. Foi demonstrado significativo desfecho neurológico favorável em 55% dos indivíduos submetidos à hipotermia, comparado a 39% em pacientes normotérmicos. Importaneamente, houve significativa redução da mortalidade no grupo hipotérmico (41%) comparado ao normotérmico (55%) (Holzer *et al.*, 2002). Na Austrália, outro estudo randomizado envolvendo 77 pacientes pós-PCR em fibrilação ventricular, tratados a partir de 2 h pós-PCR com 12 h de hipotermia (33 °C), apresentaram semelhante melhora do quadro neurológico e maior sobrevivência dos pacientes tratados (Bernard *et al.*, 2002). A partir destes estudos a *International Liaison Committee on Resuscitation* (ILCOR) e a *American Heart Association* (AHA) passaram a recomendar o tratamento com hipotermia leve (33 °C por 12-24 h) em pacientes pós-PCR, caso o ritmo da parada cardíaca fosse fibrilação ventricular (American Heart Association, 2005). Além disso, outros grupos vêm avaliando e confirmando a eficiência da hipotermia na melhora no

quadro neurológico e maior taxa de sobrevivência em pacientes pós-PCR (Testori *et al.*, 2011). Em 2013, uma meta-análise avaliou 63 estudos que comparavam pacientes normotérmicos e hipotérmicos pós-PCR, mostrando que apesar dos efeitos adversos do tratamento, a hipotermia terapêutica é um método seguro e que traz benefícios à sobrevivência durante a internação dos pacientes tanto a curto (um mês) como em médio prazo (seis meses) (Xiao *et al.*, 2013). Outra meta-análise, de 2015, não encontrou benefício significativo na sobrevivência de todos os pacientes 180 dias após o tratamento, porém este pareceu benéfico para pacientes em parada com ritmos chocáveis (fibrilação ventricular e taquicardia ventricular sem pulso) e também melhorou a função neurológica avaliada no momento da alta hospitalar (Zhang, X. W. *et al.*, 2015).

O tratamento utilizando hipotermia pode ser dividido em três etapas: **indução**, **manutenção** e **reaquecimento**, como mostrado na **Fig. 4**. Diversos estudos clínicos e em modelo animal estão tentando avaliar o melhor momento para o início da indução da hipotermia após a reanimação, que hoje é iniciado dentro das primeiras 6 h pós-ROSC (Scirica, 2013). A instituição do tratamento deve ocorrer o mais precocemente possível, uma vez que um pior prognóstico neurológico está relacionado à demora no início da terapia (Shoemaker, Appel e Kram, 1988; Bernard *et al.*, 2002; Holzer *et al.*, 2002). Porém, existem estudos que admitem não existir grandes diferenças em se induzir a hipotermia 1 ou 4 h após o ROSC (Lampe e Becker, 2011).

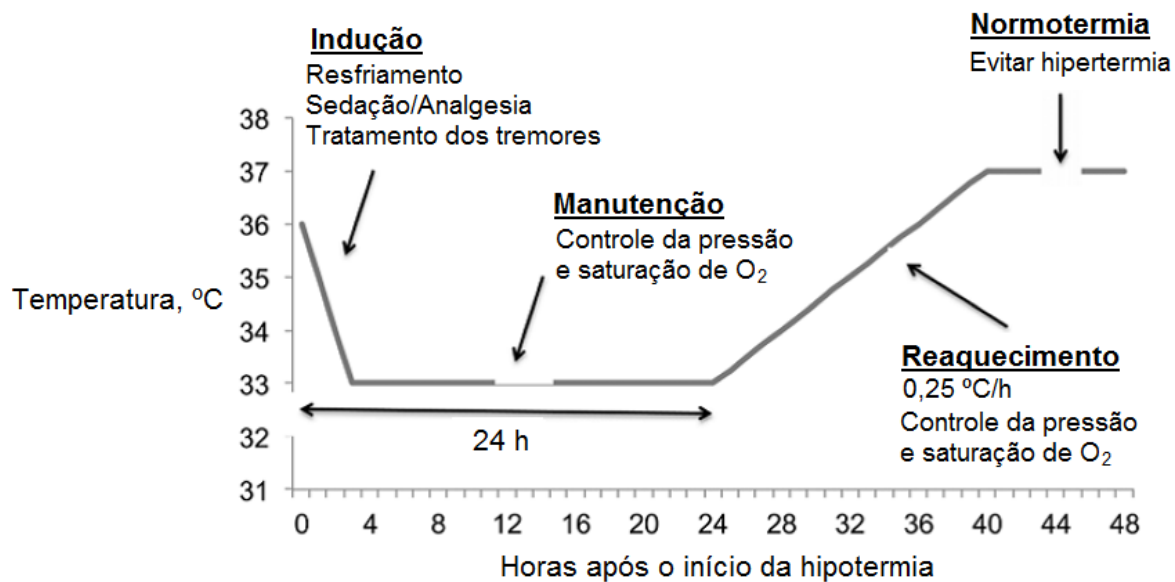


Fig. 4. Fases da hipotermia terapêutica. Modificada de Scirica, 2013.

Atualmente, utiliza-se um sistema combinado de **técnicas para a redução da temperatura corporal**, incluindo administração de salina gelada intravenosa, compressas de gelo na cabeça, pescoço, axilas e virilhas, tendas de circulação de ar frio, assim como sistemas de cobertores térmicos refrigerados com controle da temperatura automático. A utilização de sistemas automáticos de controle da temperatura corporal é muito eficiente durante o período de tratamento, pois evita flutuações na temperatura e facilita sua manutenção, já que a hipotermia deve ser mantida por um grande período de tempo, de 12 a 24 h. Os sistemas automáticos também apresentam uma grande vantagem na fase de reaquecimento, pois o aumento da temperatura deve ser lento e gradual, normalmente estipulado para ocorrer durante um período de 12 h, calculado para uma velocidade de 0,25 °C/h. O método combinado, que inclui tanto técnicas que reduzem a temperatura corporal de forma externa e interna concomitantemente é considerado ótimo, pois evita grandes variações de temperatura e reduz o tempo levado para atingir a temperatura-alvo na fase de indução. Obviamente, o organismo do paciente tentará combater a hipotermia através de tremores. Por esse motivo, bloqueadores neuromusculares são utilizados para evitar o

aumento da taxa metabólica e a geração de calor durante todas as fases do tratamento, assim como sedativos para reduzir a dor e o desconforto gerados pela redução da temperatura corporal (Nolan *et al.*, 2008; Scirica, 2013).

Além dos estudos clínicos realizados em pacientes internados, estudos prévios e mais atuais em **modelo animal** têm reafirmado o benefício neurológico da hipotermia leve pós-PCR (Stephenson, Reid e Hinton, 1953; Sterz *et al.*, 1991; Ginsberg *et al.*, 1992; Weinrauch *et al.*, 1992; Kuboyama *et al.*, 1993; Safar *et al.*, 1996; Colbourne, Li e Buchan, 1999; Gong *et al.*, 2012) e também o aumento da sobrevivência dos indivíduos através do tratamento. A **Fig. 5** mostra a evidente melhora no quadro neurológico em porcos tratados com 12 h de hipotermia leve, 24 e 72 h pós-PCR (**Fig. 5**).

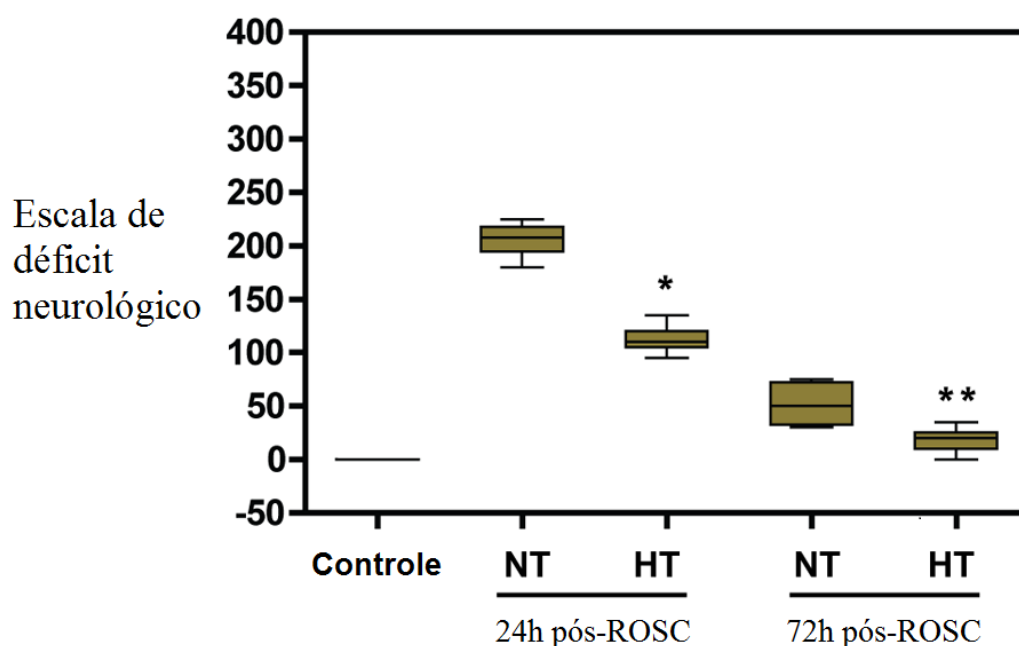


Fig. 5. Redução do déficit neurológico 24 e 72 h pós-parada cardíaca em porcos tratados com 12 h de hipotermia leve. Figura modificada Gong et al, 2012. NT, grupo normotérmico. HT, grupo hipotérmico.

No tecido cerebral de ratos tratados com hipotermia a 32-33 °C por 24 h, foi evidenciada a redução da perda de células neuronais e da liberação das citocinas

inflamatórias fator- α de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) (Xiong *et al.*, 2009). Ainda, em modelo de PCR em ratos comparando 5 e 7 min de parada e três diferentes durações de hipotermia terapêutica, 1, 2 e 4 h, o marcador de dano neuronal S100B e o dano ao hipocampo evidenciado por histologia foram significativamente menores quanto maior o tempo de hipotermia. Também, a sobrevivência foi maior independente da duração da parada (Tsai *et al.*, 2015). Além disso, o tratamento teve melhores resultados para a sobrevivência dos animais quanto mais cedo era iniciado. Iniciando-se o tratamento 0, 1, 4, ou 8 h após o ROSC a sobrevivência foi 45%, 36%, 36% e 14% respectivamente, e a taxa de função neurológica foi 24%, 24%, 19% e 0% respectivamente, sendo que no grupo 8 h após o ROSC, não foram apresentadas diferenças significantes em relação ao grupo normotérmico em ambos os parâmetros (Che *et al.*, 2011).

A hipotermia pode reduzir o dano em diferentes tecidos. A proteção do corpo pelo tratamento em hipotermia traz a vantagem da proteção de todos os órgãos, já que a falha múltipla de órgãos pode ocorrer durante a SPCR. O dano hepático, o infarto do miocárdio, o dano renal e aos tecidos musculares estão diminuídos em porcos pós-parada tratados com hipotermia (Ostadal *et al.*, 2013). Também, este mesmo estudo mostrou que a saturação de O₂ e a pressão arterial foram restauradas pela hipotermia (Ostadal *et al.*, 2013). Quando maior o tempo de hipotermia em ratos pós-PCR, melhor o quadro hemodinâmico, menor o dano ao miocárdio e menores os níveis de troponina-1 (Tsai *et al.*, 2015). Ainda, ratos em parada por asfixia durante 8,5 min e 32 °C de hipotermia, além da melhora no quadro hemodinâmico, apresentaram redução da disfunção e dano mitocondriais no tecido miocárdico (Huang *et al.*, 2015).

Entretanto, a hipotermia pode não melhorar o desfecho e sobrevivência dos **pacientes em casos mais graves**, como casos de parada cardiorrespiratória que chegam à

emergência apresentando ritmos não-chocáveis (assistolia e atividade elétrica sem pulso). Hachimi-Idrissi demonstrou, em um estudo clínico randomizado, melhora no desfecho neurológico dos pacientes sob hipotermia com parada em ritmos não-chocáveis, apesar de não ter sido encontrado diferença de mortalidade entre os grupos (Hachimi-Idrissi *et al.*, 2001). Dois outros estudos (Kim *et al.*, 2007; Hay *et al.*, 2008) em pacientes com ritmos não-chocáveis mostraram melhor desfecho neurológico através da terapêutica hipotérmica, também sem diferença na mortalidade. Atualmente, a hipotermia é recomendada para todos os ritmos de PCR (Shoemaker, Appel e Kram, 1988; Bernard *et al.*, 2002; Holzer *et al.*, 2002).

A hipotermia terapêutica não é recomendada para todos os pacientes internados que sofreram a PCR. Existem condições médicas em que a hipotermia pode agravar o quadro do paciente ou trazer outros riscos. Essas condições podem ser: hemorragia intracranial e hemorragia severa, hipotensão refratária a medicações vasopressoras, sepse severa e gravidez (Scirica, 2013). A maioria dos estudos tem mostrado que hipotermia não tem efeitos adversos na hemodinâmica durante a SPCR (Sagalyn *et al.*, 2009) e os **efeitos colaterais** são considerados pouco importantes quando comparados à melhora dos pacientes (Testori *et al.*, 2011). Apesar disso, é preciso sempre levar em consideração os efeitos adversos ao manter a temperatura corporal baixa, sendo os mais comuns: pneumonia (48%), desequilíbrio de eletrólitos (37%), convulsão (24%), arritmias (14%), sangramento (6%) e sepse (4%) (Nielsen *et al.*, 2011).

Estudos serão necessários para elucidar os mecanismos pelos quais a hipotermia traz benefícios aos pacientes e, através deles, qual seria o protocolo ótimo de hipotermia terapêutica, maximizando seu potencial de proteger os tecidos em pacientes reanimados pós-PCR.

1.3 Estresse oxidativo e I/R pós-PCR

Isquemia é a lesão tecidual causada pela privação de O₂, nutrientes e remoção de metabólitos devido à interrupção do fluxo sanguíneo normal. A PCR é um evento isquêmico que atinge todos os tecidos do corpo. A reanimação pós-PCR é uma intervenção médica que leva à **reperusão**, sendo assim um processo artificial, em que o organismo não está preparado para o retorno abrupto da circulação sanguínea e principalmente, para o retorno do O₂ aos tecidos (Nolan *et al.*, 2008). Isto significa que apesar do significativo dano sofrido pela isquemia, a reperusão agrava ainda mais este dano, já que a reoxigenação abrupta que ocorre durante a reperusão causa a geração excessiva de radicais livres e outras espécies reativas (Garcia-Dorado e Piper, 2006), como ilustrado na

Fig. 6.

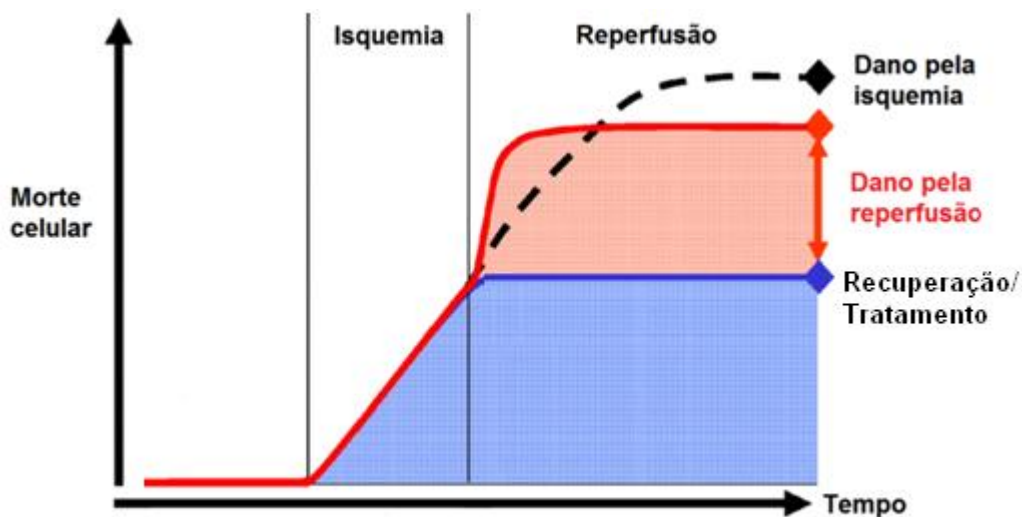


Fig. 6. Comparação do dano aos tecidos causado durante a fase de isquemia e durante a fase de reperusão. Modificado de Garcia-Dorado e Piper, 2006.

Os episódios de I/R estão associados a processos de oxidação/redução de compostos que levam ao aumento de radicais livres e outras espécies reativas, gerando **estresse**

oxidativo. Têm-se sugerido que essa produção de espécies reativas, especialmente o **radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)**, seja uma das causas de maior importância no dano tecidual sofrido por pacientes que sofreram eventos isquêmicos. Uma forte evidência desta teoria é que são cada vez mais frequentes os estudos criticando o uso de 100% de O_2 na ventilação mecânica. Apesar da utilização de 100% de O_2 ser frequente nas UTIs, esta prática comprovadamente leva a maior dano neurológico quando utilizada nas primeiras horas da SPCR. Recomenda-se, em vez disso, o ajuste da FiO_2 a fim de se atingir uma saturação de O_2 arterial de 94-96% (Balan *et al.*, 2006). Desta forma, o estudo do estresse oxidativo é de fundamental importância para se entender a fisiopatologia da SPCR, permitindo o desenvolvimento de terapias mais específicas e melhor adaptadas ao paciente que sofre parada cardíaca, assim como outros processos que envolvem I/R, como procedimentos de transplante, por exemplo.

O estresse oxidativo, em sistemas biológicos, é caracterizado por um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e seus respectivos agentes antioxidantes. As espécies reativas podem ser divididas em espécies radicalares e não-radicalares. As espécies radicalares, **ou radicais livres**, são átomos ou moléculas que possuem um átomo com um ou mais elétrons desemparelhados. Isso confere aos radicais livres a capacidade de reagir mais rapidamente com outras moléculas para emparelhar os elétrons em seus orbitais. Eles são representados pela molécula/átomo com um círculo cheio sobrescrito, como por exemplo o radical superóxido, $O_2^{\bullet-}$. As espécies reativas não-radicalares, apesar de serem menos reativas, podem reagir com radicais livres e metais de transição como o ferro (Fe^{++}) e o cobre (Cu^{++}) gerando mais radicais livres, como ocorre frequentemente com o peróxido de hidrogênio, H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge, 2015).

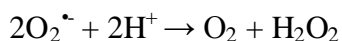
O aumento de espécies reativas ou redução de defesas antioxidantes está envolvido em processos de dano a diversas moléculas biológicas. É importante ressaltar que apesar do dano gerado pelo estresse oxidativo, algumas espécies reativas são vitais em diversos **processos fisiológicos**, já que organismos aeróbios utilizam o O_2 em reações de oxidação e redução em seu metabolismo normal. Um importante exemplo é a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, onde ocorre a formação de água (H_2O) a partir da aceção de elétrons pelo O_2 . Durante este processo, EROs são liberadas, dentre elas o H_2O_2 , o radical $O_2^{\cdot-}$, o radical hidropoxila (HO_2^{\cdot}), o radical hidroxila ($\cdot OH$), sendo este último o mais reativo em sistemas biológicos, devido a sua facilidade em reagir com metais, outros radicais ou qualquer molécula biológica. A geração de EROs também participa na fagocitose, na regulação do crescimento celular e na sinalização intra- e intercelular. Por exemplo, a ERN óxido nítrico ($\cdot NO$) é um vaso dilatador e a ERO $O_2^{\cdot-}$ é um vasoconstritor, sendo que o equilíbrio entre os dois regula a pressão sanguínea. Eles participam na regulação de eventos fisiológicos normais, apesar de ambos serem radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Apesar da participação das espécies reativas em processos fisiológicos, a sua geração precisa ser controlada. Principalmente por que a geração excessiva de espécies reativas participa na sinalização em vias de sinalização de morte celular. Por exemplo, baixos níveis de H_2O_2 sinalizam a ativação de rotas de apoptose, enquanto altos níveis de H_2O_2 levam a necrose (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Por esse motivo, é necessário um **equilíbrio entre espécies reativas e antioxidantes**. Assim, os organismos desenvolveram, ao longo da evolução, mecanismos de defesas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. As principais defesas antioxidantes enzimáticas podem ser exemplificadas pela superóxido dismutase (SOD), a

glutationa peroxidase (GPx), a peroxirredoxina (PRx) e a catalase (CAT), e suas reações estão sintetizadas na **Fig. 7** abaixo.

A enzima **SOD** pode ter o papel mais relevante na defesa contra o dano pós-PCR já que, como evidenciado na **Fig.7**, a maioria absoluta das rotas geradoras de espécies reativas pós-I/R forma o radical $O_2^{\cdot-}$ (melhor detalhado no tópico sobre fontes de espécies reativas abaixo no texto). A SOD dismuta o radical $O_2^{\cdot-}$ através da reação:



Além disso, a enzima SOD está presente na mitocôndria, na isoforma MnSOD, no citoplasma, na isoforma CuZnSOD e no meio extracelular na isoforma EC-SOD ou CuZnSOD extracelular. Porém, a SOD gera H_2O_2 , que apesar de pouco reativo pode reagir com o Fe^{++} e o Cu^{++} , formando $\cdot OH$ (Halliwell e Gutteridge, 2015).

A **GPx** age sobre o H_2O_2 e outros peróxidos (ROOH), incluindo peróxidos lipídicos (LOOH). Sua atividade utiliza a oxidação da glutathiona reduzida (GSH), através da reação $ROOH + 2GSH \rightarrow GSSG + H_2O + ROH$. A GPx existe em várias isoformas (possivelmente 8), existindo na mitocôndria, no citoplasma e no meio extracelular. A GPx-1 é a isoforma presente em eritrócitos. A glutathiona oxidada (GSSG) é reduzida a 2GSH pela enzima glutathiona redutase (GR). As **PRx** são uma complexa família de peroxidases que agem sobre H_2O_2 , ROOH e peroxinitrito ($ONOO^-$). Até o momento foram descritas 6 isoformas, extremamente abundantes no citoplasma, porém existindo também na mitocôndria e no meio extracelular. Por exemplo, a PRx-2 só é menos abundante que a hemoglobina em eritrócitos. Como sua catálise depende da oxidação de seus resíduos de cisteína, ela precisa ser reduzida pela tioredoxina (TRX) para recuperar sua função (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Existem outras enzimas menos estudadas que contribuem para a proteção contra o dano oxidativo, como a enzima **paraoxonase (PON)**. Ela age sobre alguns organofosfatos e está presente em mamíferos em 3 isoformas. A PON-1 é a isoforma sérica presente nos complexos das lipoproteínas de alta densidade (HDL, do inglês *high-density lipoproteins*). Ela pode ter importância em diversos eventos cardiovasculares, pois reduz lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low-density lipoproteins*) oxidadas, que participam no desenvolvimento da aterosclerose. Outra enzima antioxidante pouco estudada é a **glutathione-S-transferase (GST)** que atua na detoxificação de xenobióticos e alguns peróxidos lipídicos endógenos utilizando a GSH como substrato. A GST está presente no citoplasma, mitocôndrias e microsomas (Halliwell e Gutteridge, 2015).

A **GSH** é o mais importante antioxidante endógeno **não-enzimático**, pois está presente em grandes concentrações no citoplasma. Ela está envolvida na detoxificação de xenobióticos, como por exemplo o paracetamol, clorofórmio e nitratos orgânicos, e na redução de peróxidos endógenos. Ela reage espontaneamente com esses compostos ou através da atividade das enzimas GPx e GST. Existe também uma importante participação de outros antioxidantes não-enzimáticos, que podem ser endógenos ou adquiridos através da dieta, incluindo carotenoides, flavonoides, ácidos graxos poliinsaturados, tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), ácido úrico, hormônios esteroides como progesterona e estradiol, entre outros (Halliwell e Gutteridge, 2015).

O estresse oxidativo leva ao dano às biomoléculas, como a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e oxidação de ácidos nucleicos, como sintetizado na **Fig. 7** abaixo. Os **marcadores do dano** em biomoléculas têm sido utilizados para avaliar o dano oxidativo. A mensuração de grupos carbonila é a técnica mais amplamente utilizada para inferir o dano oxidativo em proteínas. A oxidação das cadeias laterais de aminoácidos ocorre principalmente pelo H_2O_2 ou pelo próprio O_2 , através da reação com metais de

transição como Fe^{++} e Cu^{++} . Os aminoácidos mais frequentemente oxidados, gerando grupos carbonila neste processo são a lisina, arginina, prolina e histidina (Halliwell e Gutteridge, 2015). O malondialdeído (MDA) é um dos subprodutos da peroxidação lipídica e importante marcador de dano oxidativo em lipídios (Halliwell e Gutteridge, 2015). Outro marcador de peroxidação lipídica são os níveis de isoprostanos. Estes mediadores lipídicos são formados, assim como o MDA, a partir da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados. Os F2-isoprostanos são considerados o mais confiável e mais estável marcador de peroxidação lipídica, e são gerados a partir do ácido araquidônico. Os níveis de F2-isoprostanos são amplamente utilizados no estudo do estresse oxidativo em diversas doenças. O 4-hidroxinonenal (HNE) é outro marcador de peroxidação lipídica frequentemente utilizado, formados pela oxidação de ácidos graxos poliinsaturados ω -6. As consequências mutagênicas da ação do estresse oxidativo podem ser inferidas pela utilização do marcador de dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*), a 8-hidroxi guanosina (8-OHdG), resultante da oxidação do nucleosídeo guanosina (Halliwell e Gutteridge, 2015).

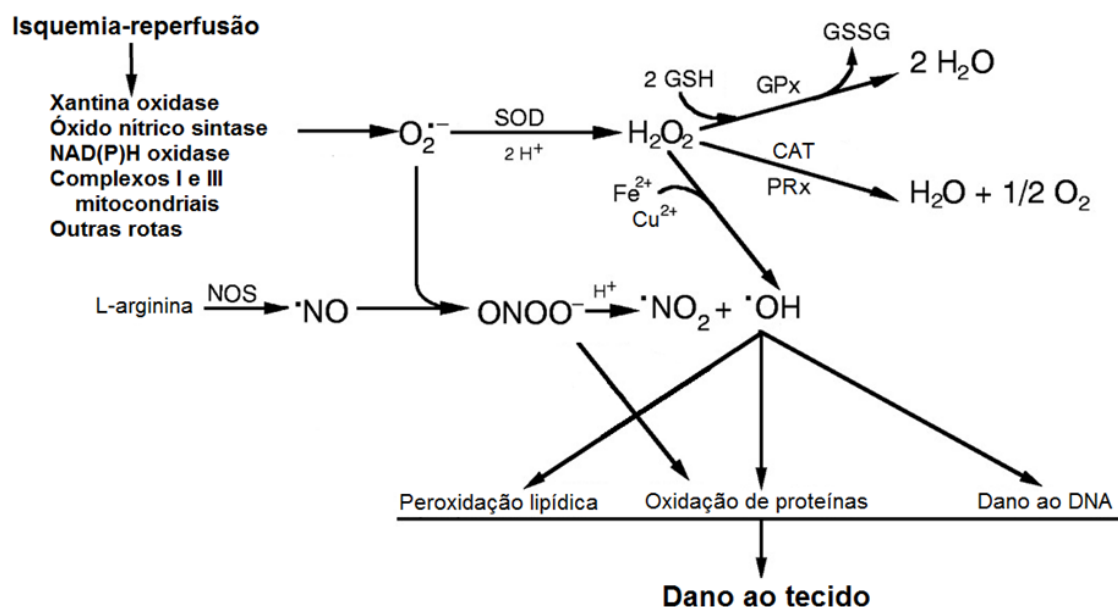


Fig. 7. Figura esquemática resumindo as principais rotas de formação de espécies reativas em eventos de isquemia-reperusão e as possíveis defesas antioxidantes que podem reduzir o dano tecidual pós-parada. Modificada de Warner, Sheng e Batinic-Haberle, 2004.

Poucos estudos avaliaram **marcadores de estresse oxidativo em pacientes pós-PCR**. Um dos poucos estudos neste sentido mostrou que os níveis de peroxidação lipídica pelo método do ácido tiobarbitúrico e da taxa modificação oxidativa da albumina estão significativamente aumentados em pacientes com pior desfecho neurológico (Turedi *et al.*, 2009). Outro estudo calculou a razão entre o status oxidante total e capacidade antioxidante total e a comparou com a falha e o sucesso de reanimação, mostrando que quanto maior o “índice de estresse oxidativo” maior o risco de mortalidade (Yucel *et al.*, 2015). É importante ressaltar que neste estudo foi utilizada a razão entre o teste status oxidante total (TOS, do inglês *total oxidant status*) para a avaliação da geração de espécies reativas e o teste capacidade antioxidante total (TAC, do inglês *total antioxidant capacity*) para avaliar a atividade antioxidante nesses pacientes, chamando esta razão de “índice de estresse oxidativo” (OSI, do inglês *oxidative stress index*). Esses dois métodos são amplamente generalistas e não apresentam nenhuma informação precisa sobre o dano oxidativo ou a atividade antioxidante nestes pacientes, muito menos a razão entre os dois. São necessários métodos mais precisos para compreender o estresse oxidativo na SPCR.

Em modelo experimental de I/R em ratos, o marcador de dano oxidativo em lipídios MDA aumentou significativamente no músculo esquelético, evidenciando que também podem ocorrer importantes danos às biomembranas. Concomitantemente, a atividade de SOD e GPx também estavam significativamente menores, o que pode significar que o dano pós-I/R pode prejudicar a atividade antioxidante do tecido (Ozkan *et al.*, 2015). O aumento nos níveis de MDA e a diminuição da atividade de SOD também foram evidenciados em

intestino, fígado e pulmão pós-I/R (Tekin *et al.*, 2009). Resultados semelhantes também já foram encontrados no fígado em outro estudo (Abdel-Gaber *et al.*, 2015).

1.4. Fontes de espécies reativas na I/R pós-PCR

As **fontes de espécies reativas** durante a I/R ainda estão sendo estudadas, porém a xantina oxidoreductase (XDR) é considerada como a principal fonte de radicais livres e espécies reativas que levam ao dano pós-I/R. Esta enzima é sintetizada como xantina desidrogenase (XDH), forma mais abundante em tecidos saudáveis (90%), a qual transfere elétrons para o nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), oxidando a xantina ou hipoxantina em ácido úrico. Quando o tecido sofre dano (como em processos isquêmicos), algumas XDH são oxidadas a **xantina oxidase (XO)**, que passa a utilizar O_2 como acceptor de elétrons em lugar do NAD^+ , gerando $\text{O}_2^{\cdot-}$. Além disso, o consumo de ATP em tecidos hipóxicos causa o acúmulo de hipoxantina e xantina, que pode reagir com a XO gerando mais EROs. Somando-se a isso, o dano endotelial pode ocasionar a liberação de XDH no plasma, sendo rapidamente convertida em XO (Cuzzocrea *et al.*, 2001). Uma clara evidência da participação da XO em eventos isquêmicos é que a inibição da atividade da XO endotelial pelo alopurinol diminui substancialmente a geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o dano oxidativo pós-I/R (Angelos *et al.*, 2006).

Apesar do importante papel da XO nas vias de dano oxidativo pós-I/R, **outras rotas contribuem para a geração de espécies reativas**. Por exemplo, fagócitos como os neutrófilos contribuem para este dano, principalmente em eventos isquêmicos que levam a necrose. Neutrófilos produzem H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$ através da atividade da **NADPH oxidase**. As espécies reativas podem também ser geradas pelas mesmas e por outras vias, como as NAD(P)H oxidases, os **complexos I (NAD desidrogenase) e III (ubiquitina citocromo C**

redutase) da cadeia transportadora de elétrons, as ciclooxigenase/lipooxigenase e o citocromo *P*-450 (Angelos *et al.*, 2006). Por exemplo, a inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) evita o dano hepático pós-I/R (Abdel-Gaber *et al.*, 2015), evidenciando sua importância neste processo.

O **radical livre** $\cdot\text{NO}$ tem importante papel no sistema circulatório e conseqüentemente na SPCR. Ele é um sinalizador celular, levando a vasodilatação endotelial. Além disso, inibe a adesão de monócitos às células endoteliais, reduz processos inflamatórios e também é inibidor da agregação plaquetária (Vanhoutte, 2009). Devido a estas essas características, o $\cdot\text{NO}$ é considerado um protetor cardiovascular, mesmo sendo um radical livre. O $\cdot\text{NO}$ é sintetizado a partir da L-arginina pela família das enzimas **óxido nítrico sintases (NOS)**, classificadas em NOS neuronal (nNOS), NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS). A eNOS ou NOS3, é responsável pela maior parte da produção do $\cdot\text{NO}$ vascular, estando presente no plasma sanguíneo, nas células endoteliais e nos eritrócitos (Kleinbongard *et al.*, 2003). A atividade da eNOS é alterada pelo estresse oxidativo. Em condições normais, a enzima produz $\cdot\text{NO}$, mas em condições de hipóxia passa a produzir grandes quantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Desta forma, o $\cdot\text{NO}$ terá maior probabilidade de reagir com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ formando o ONOO^- , molécula altamente reativa, importante no dano oxidativo a proteínas (Halliwell e Gutteridge, 2015).

A regulação da eNOS é complexa e algumas moléculas participam alterando sua atividade. A dimetil arginina assimétrica (ADMA, do inglês *asymmetric dimethylarginine*) é uma molécula endógena inibidora da NOS e, conseqüentemente, reduz a produção de $\cdot\text{NO}$ (Dayoub *et al.*, 2003; Stuehlinger *et al.*, 2007). Ela vem sendo estudada como alternativa de tratamento de doenças cardiovasculares e da disfunção endotelial, pois a redução de seus níveis poderia aumentar a produção de $\cdot\text{NO}$. Neste sentido, a atividade da enzima dimetilargininase (DDAH, do inglês *dimethylarginine dimethylaminohydrolase*)

pode ser outro foco de terapias que tem como objetivo alterar a atividade da NOS, já que a inibição da DDAH gera acúmulo de metilargininas como a ADMA, bloqueando a produção de $\cdot\text{NO}$ (Leypoldt *et al.*, 2009).

A **Fig. 8** sintetiza a formação das espécies reativas de maior importância pós-PCR, $\text{O}_2^{\cdot-}$, ONOO^- e $\cdot\text{OH}$, importantes geradoras de dano na I/R.

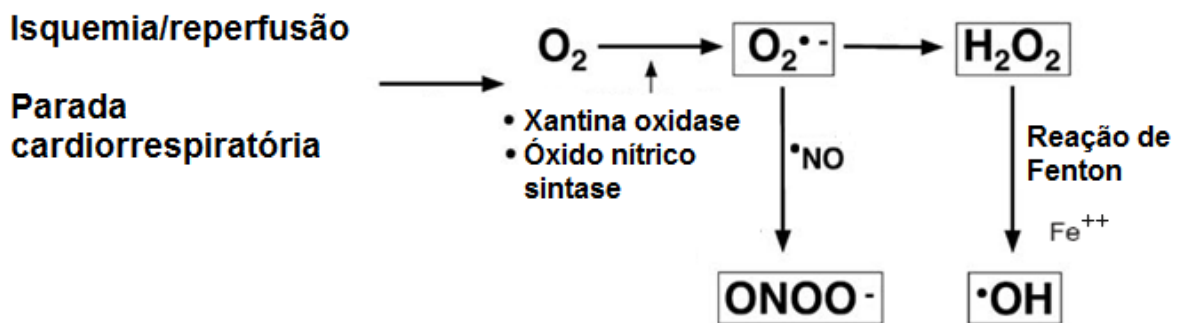


Fig. 8. Esquema da formação de radicais livres e importantes espécies reativas pela isquemia-reperfusão pós-parada cardíaca. Modificada de Halliwell e Gutteridge, 2015.

A **disfunção mitocondrial** também ocorre após eventos de I/R, e é caracterizada pela diminuição da atividade de alguns componentes da cadeia transportadora de elétrons, aumentando a produção de EROs acima dos níveis normais. Este aumento na produção de EROs, principalmente $\text{O}_2^{\cdot-}$, pelos complexos I e III ativa rotas de sinalização celular dependentes de p53 e caspase-2 que levam à apoptose. Além disso, a superprodução de EROs também leva à necrose (Gong *et al.*, 2012; Halliwell e Gutteridge, 2015). Estudos utilizando modelos experimentais mostram que a disfunção mitocondrial ocorre em diferentes tecidos pós-I/R, incluindo tecido cerebral (Li *et al.*, 2014), miocárdio (Cai *et al.*, 2015) e também no tecido hepático, onde foi mostrado que as espécies reativas formadas pós-I/R são produzidas através dos complexos I e III (Mukhopadhyay *et al.*, 2012). Os radicais livres formados a partir da I/R também levam a modificação de proteínas

mitocondriais pelo HNE que ocorre em consequência da disfunção mitocondrial, contribuído ainda mais para a mesma (Xu *et al.*, 2008).

1.5 Dano aos tecidos e alterações metabólicas pós-I/R

Devido a severidade do **dano sofrido pelos tecidos** pela I/R pós-PCR, a reanimação cardiopulmonar reverte somente parcialmente a circulação normal do paciente, com um retorno do débito cardíaco abaixo do normal, assim como uma taxa de liberação de O₂ muito menor que o fisiológico. Atualmente, é sabido que parte desse processo de disfunção endotelial ocorre como consequência do estresse oxidativo (Karimova e Pinsky, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2015). A disfunção endotelial pós-I/R resulta em vasoconstrição, ativação plaquetária e de leucócitos, aumento da produção de oxidantes e de extravasamento de proteínas e fluídos. A disfunção microvascular é também uma importante manifestação da lesão reperfusional, que prejudica a circulação nos tecidos expostos. Também ocorre a liberação de hormônios de estresse, como catecolaminas e cortisol, além da ativação de rotas de inflamação sistêmica (Verma *et al.*, 2002).

O dano tecidual pós-I/R está relacionado a muitas doenças, incluindo infarto do miocárdio, tromboembolismo, angina, insuficiência vascular periférica, entre outros. Isto também é evidenciado através de estudos de I/R experimentais, que têm mostrado que as espécies reativas levam a danos cerebrais, disfunção contrátil do miocárdio, arritmias, lesão pulmonar e alterações no metabolismo celular (Bolli e Patel, 1988; Jurmann *et al.*, 1990; Bolli, 1998). Outra importante consequência do dano tecidual causado pela I/R é o dano intestinal, que permite que bactérias e endotoxinas entrem na circulação, causando o quadro de sepse, frequente em pacientes pós-PCR (Nolan *et al.*, 2008). Músculos são mais resistentes à lesão isquêmica comparados ao tecido cerebral (Maxwell e Lip, 1997) e por

esse motivo o dano cardíaco da I/R e frequentemente reversível, enquanto o dano ao tecido cerebral é muitas vezes irreversível.

O **dano pós-I/R ao tecido cerebral** foi o mais bem estudado até o presente momento devido a sua grande importância, pois é o mais rapidamente atingido pela falta de O₂. Neste tecido, a falta de O₂ na circulação cessa o metabolismo aeróbico em 20 seg, levando o indivíduo à perda da consciência. Em 5 min de completa anóxia cerebral, reduz-se a concentração de O₂ abaixo do nível crítico, o que bloqueia a fosforilação oxidativa, diminuindo drasticamente a formação de adenosina trifosfato (ATP); assim, os níveis de glicose são consumidos através da glicólise anaeróbica. A partir desta fase a atividade neuronal cessa e se a oferta de O₂ não for rapidamente restaurada, inicia-se o processo de morte celular (Rivers, Martin, *et al.*, 1992; Rivers, Rady, *et al.*, 1992). A anóxia produz despolarização das membranas celulares, com influxo de Ca⁺⁺ do retículo endoplasmático para o citoplasma e acidose láctica devido a alta produção de lactato pela glicólise. O Ca⁺⁺ causa a ativação de proteinases e fosfolipases intracelulares e síntese de óxido nítrico (NO). Esses processos também levam ao colapso do gradiente iônico, resultando na liberação inapropriada de neurotransmissores. Assim, aminoácidos excitatórios como glutamato também podem mediar a morte celular pós-I/R (Oku *et al.*, 1994; Sander *et al.*, 2007; Halliwell e Gutteridge, 2015). Concomitante a esses processos, radicais livres e outras espécies reativas associadas à resposta inflamatória acabam levando a danos neurológicos adicionais (Benjamin *et al.*, 1987; Rivers, Martin, *et al.*, 1992; Rivers, Rady, *et al.*, 1992). Esses processos estão sintetizados na **Fig. 9** e ocorrem de forma semelhante em outros tecidos, porém não tão rapidamente.

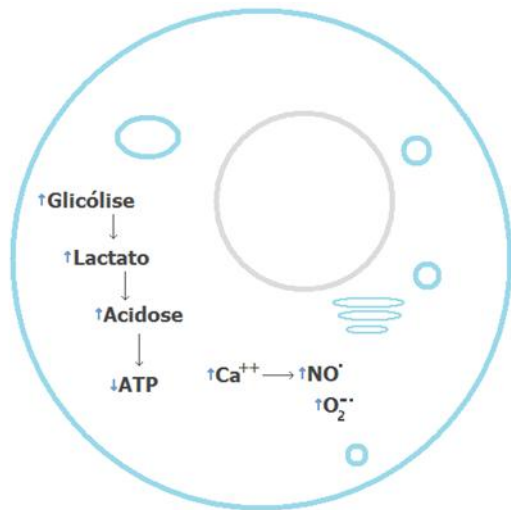


Fig. 9. Principais alterações metabólicas intracelulares após um evento de isquemia-reperfusão.

Existe um grande interesse na determinação de **marcadores de dano neuronal** sanguíneos pós-PCR, por serem reprodutíveis, pouco invasivos e aplicáveis clinicamente. Esses marcadores podem ser utilizados para acompanhar a recuperação do paciente, a eficácia dos tratamentos aplicados e seu prognóstico antes da alta hospitalar. Dois marcadores de dano neuronal têm sido amplamente aplicados tanto em estudos clínicos como em modelos experimentais, os níveis séricos das proteínas S100B e enolase neurônio-específica (NSE, do inglês *neuron-specific enolase*) (Shinozaki *et al.*, 2009; Stammet *et al.*, 2015). Durante a SPCR, esses marcadores podem ser utilizados para avaliar a morte de células neuronais e o dano à barreira hematoencefálica causados pela I/R. Porém, um estudo comparativo entre os dois marcadores concluiu que a proteína S100B é um melhor preditor de desfecho neurológico nas primeiras 24 h pós-PCR (Shinozaki *et al.*, 2009). A proteína S100B é um homodímero presente no citoplasma e núcleo de astrócitos da glia e é liberada na circulação em situações de evidente dano neuronal.

O estresse oxidativo também pode estar relacionado ao **dano da I/R ao tecido cardíaco**, contribuindo para o dano tecidual e o *stunning* do miocárdio que causam a

disfunção contrátil do miocárdio pós-PCR. Uma das principais hipóteses para explicar esses eventos pode ser a perda da sensibilidade dos filamentos contráteis ao Ca^{++} através do dano aos cardiomiócitos (Bolli, 1998). O dano oxidativo aos cardiomiócitos, reduzindo sua contratilidade, já foi evidenciado em modelo murino de choque séptico (Celes *et al.*, 2010). Esses animais apresentaram aumento da concentração intracelular de albumina consequente do aumento da permeabilidade da membrana plasmática. A redução da contratilidade dos cardiomiócitos através do dano oxidativo também pode estar relacionada ao desarranjo da actina e miosina da estrutura sarcomérica, já que o HNE produzido pela peroxidação lipídica danifica a função destas proteínas. As modificações que o dano oxidativo causa à permeabilidade das membranas e à contratilidade dos cardiomiócitos podem participar de forma semelhante na perda da função do miocárdio durante a I/R (Celes *et al.*, 2010). Outro estudo também corroborou estas ideias, mostrando que EROs induzem mudanças no ritmo cardíaco, ativando a proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII) pela oxidação da metionina, modificando a homeostase celular de íons, e assim contribuindo para a perda da função do miocárdio (Erickson *et al.*, 2008). Outra evidência de que o estresse oxidativo está envolvido no mecanismo de dano ao miocárdio pós-PCR é que o tratamento com antioxidantes reduz a injúria dos tecidos. Por exemplo, o ácido retinoico reduziu a área de infarto e melhorou a perda da fração de ejeção da função cardíaca e reduziu a taxa apoptose dos cardiomiócitos pós-I/R em camundongos (Zhu *et al.*, 2015).

Atualmente, a troponina-T cardíaca altamente sensível (hs-cTnT, do inglês *high-sensitivity cardiac troponin T*) é considerada o melhor **marcador sanguíneo para avaliação do dano ao miocárdio**. A hs-cTnT é uma técnica que quantifica com grande precisão as troponinas-T que fazem parte das miofibrilas contráteis exclusivamente no tecido cardíaco. Quando ocorrem processos de dano ou morte em cardiomiócitos, a

troponina-T é liberada no tecido e na circulação, podendo ter seus níveis quantificados. Os níveis de hs-cTnT são usados em conjunto com outras avaliações do paciente para avaliar a recuperação do dano cardíaco (O'connor *et al.*, 2015).

Importantemente, os níveis dos **marcadores inflamatórios** interleucina-1 β (IL-1 β) e o TNF- α estão aumentados pós-I/R em diversos tecidos, reforçando a ideia de que a I/R leva a inflamação sistêmica (Abdel-Gaber *et al.*, 2015; Ozkan *et al.*, 2015). Estes mesmos marcadores inflamatórios, IL-1 β e o TNF- α , estão relacionados ao dano neuronal pós-I/R (Neumar, 2000).

A **acidose metabólica** é frequente em pacientes pós-PCR. O lactato contribui mais significativamente para a acidose metabólica e o desenvolvimento da acidemia, porém o fosfato também participa deste processo. Concomitantemente, existe uma resposta compensatória à acidose, podendo levar a elevação dos níveis de magnésio (Mg⁺⁺) e Ca⁺⁺, por exemplo (Makino *et al.*, 2005). A concentração de lactato é alta logo após o ROSC e a rápida redução os níveis de lactato durante a SPCR é considerada sinal de melhor desfecho clínico. Por esse motivo, os dados obtidos pela gasometria, que já faz parte da rotina de acompanhamento dos pacientes em UTI, traz importantes informações sobre a acidose, como o pH, nível de íons, dentre outras informações sobre alterações metabólicas nesses pacientes.

1.6 Influência da hipotermia terapêutica na I/R pós-PCR e estresse oxidativo

O **mecanismo** pelo qual a diminuição da temperatura corporal reduz o dano aos tecidos e melhora o prognóstico dos pacientes ainda não é claro. As hipóteses centrais a respeito dos benefícios da hipotermia envolvem a redução do metabolismo celular e da demanda de O₂, apesar de manter os níveis de ATP (adenosina trifosfato) dentro de níveis

próximos aos normais. Além disso, a hipotermia diminui a produção de espécies reativas, estabiliza o pH, reduz a ativação de rotas de morte celular e de inflamação (Lampe e Becker, 2011).

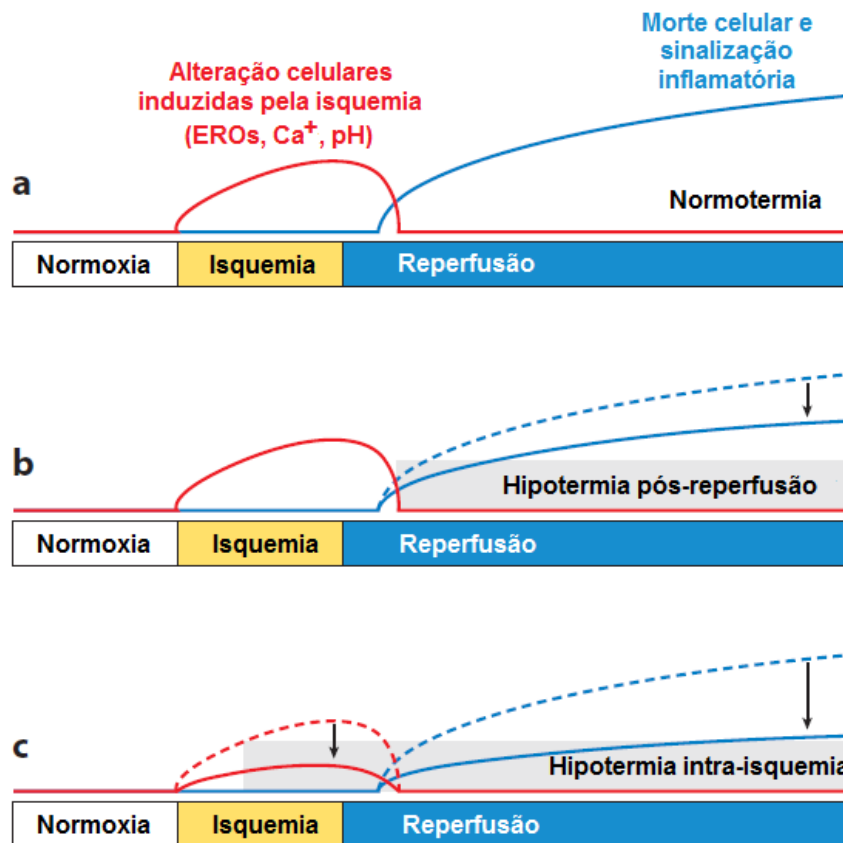


Fig. 10. Ilustração esquemática do efeito da hipotermia na isquemia-reperfusão, evidenciando que o tratamento pós-reanimação melhoram apenas parcialmente os danos gerados pela síndrome pós-parada cardiorrespiratória, e seria mais eficiente se iniciado durante o período de isquemia. Modificado de Lampe e Becker, 2011.

A hipotermia pode diminuir a produção de espécies reativas pós-PCR. Pacientes pós-parada tratados com hipotermia a 33 °C por 24 h apresentaram menor capacidade oxidante quando comparados ao grupo controle. Porém, após a fase de reaquecimento, a capacidade oxidante voltou aos mesmos níveis do grupo controle (Dohi *et al.*, 2013). Em modelo experimental de SPCR em porcos, utilizando os mesmos métodos, a geração de espécies reativas foi maior durante as primeiras 1,5 h pós-parada

(Ostadal *et al.*, 2013). Apesar disso, é importante ressaltar que nestes estudos foi utilizado um teste de capacidade oxidante (teste d-ROMs, *reactive oxygen metabolites*) para a avaliação da geração de espécies reativas, um método amplamente generalista que não apresenta informações precisas sobre quais espécies reativas estão sendo geradas nestes pacientes. Um estudo em modelo porcino de parada cardíaca mostrou que, 24 h pós-PCR, 12 h de manutenção da hipotermia diminuíram os níveis de grupos carbonila e de MDA, evidenciando que o tratamento reduziu o dano oxidativo (Gong *et al.*, 2012). Também, em modelo murino o tratamento com hipotermia diminuiu significativamente os elevados níveis de MDA pós-I/R (Ozkan *et al.*, 2015).

Outra evidência de que a diminuição do estresse oxidativo é um dos mecanismos pelos quais a hipotermia protege os tecidos foi mostrada em um estudo comparando a utilização de 21 e 100% de O₂ na ventilação mecânica em ratos pós-PCR. O déficit neurológico e o dano no hipocampo que haviam sido restaurados pelo tratamento em hipotermia nos ratos ventilados com 21% de O₂ voltou aos mesmos níveis dos animais normotérmicos quando ventilados com 100% de O₂ (Dalen *et al.*, 2012).

A **hipotermia pode alterar antioxidantes** pós-PCR. Pacientes pós-PCR tratados com hipotermia a 33 °C por 24 h apresentaram menor potencial antioxidante quando comparados ao grupo controle. Após a fase de reaquecimento, o potencial antioxidante voltou aos mesmos níveis do grupo controle (Dohi *et al.*, 2013). Porém, em modelo experimental de SPCR em porcos, a hipotermia terapêutica não apresentou diferença significativa no potencial antioxidante (Ostadal *et al.*, 2013). Nestes estudos foi utilizado o teste de capacidade antioxidante total (teste BAP, *biological antioxidant potential*) para avaliar a atividade antioxidante, que apresenta problemas técnicos semelhantes ao d-ROM. A técnica BAP engloba a capacidade antioxidante não-enzimática de forma indistintamente nas amostras, e uma técnica generalista como esta não traz informação

sobre os mecanismos pelos quais a hipotermia pode proteger os tecidos. A hipotermia recuperou as atividades das enzimas SOD e GPx que haviam sido reduzidas para 1/3 pós-I/R em músculo esquelético de ratos (Ozkan *et al.*, 2015). A atividade, a expressão e a transcrição do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) da MnSOD foi significativamente maior em porcos tratados com hipotermia durante 24 h pós-PCR, comparados com o grupo normotérmico e com o grupo controle (sem parada cardíaca) (Gong *et al.*, 2012). Esses estudos mostram que a hipotermia poder induzir (ou prevenir a redução) da atividade antioxidante enzimática na SPCR.

Além disso, a **hipotermia pode melhorar a disfunção mitocondrial** pós-PCR. Um estudo mostrou que a atividade dos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons é em parte restaurada em porcos tratados com 12 h de hipotermia 24 e 72 h pós-PCR quando comparados aos animais normotérmicos e ao grupo controle (Gong *et al.*, 2012), podendo ser um importante mecanismo de redução do estresse oxidativo pela hipotermia terapêutica.

2. JUSTIFICATIVA

Existem diversas lacunas de conhecimento quanto à fisiopatologia, tratamento e prognóstico dos pacientes que recuperam a circulação espontânea após a parada cardiorrespiratória. A elevada morbimortalidade e os altos custos relacionados aos cuidados intensivos com estes pacientes justificam a necessidade de pesquisas que busquem resultados que possam melhorar a sobrevida destes indivíduos, bem como orientar a alocação de recursos nessa área.

Desta forma, este estudo teve como objetivo contribuir para a compreensão da relação entre o estresse oxidativo e a SPCR, assim como os efeitos da hipotermia terapêutica no tratamento de pacientes pós-PCR, a fim de fornecer conhecimento para o manejo mais acurado dos indivíduos, resultando em maior sobrevida desta população. Os mecanismos que levam ao menor dano neurológico e cardíaco, assim como em outros tecidos, em pacientes durante a SPCR ainda não está elucidado, e necessitam de uma investigação mais detalhada.

3. OBJETIVO GERAL

Durante os últimos anos, a introdução da ressuscitação cardiopulmonar tem contribuído para aumentar o sucesso das reanimações e, portanto a incidência da SPCR. A utilização da hipotermia terapêutica está em discussão, e tem demonstrado diversos benefícios para estes pacientes. Porém, os aspectos bioquímicos e moleculares da síndrome são pouco compreendidos. Desta forma, pretendemos verificar a relação entre o estresse oxidativo e a SPCR, assim como a influência da hipotermia como tratamento desses pacientes.

Desta forma este estudo está dividido em dois capítulos:

O **primeiro capítulo** teve como objetivo compreender a relação entre marcadores de dano oxidativo e a disfunção do miocárdio pós-PCR em modelo experimental em ratos. Neste estudo, realizado no Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, em Milão-Itália, a disfunção do tecido miocárdico, assim como o dano aos cardiomiócitos foram comparados a marcadores de dano oxidativo. Os marcadores foram avaliados no sangue e no miocárdio de ratos eutanasiados 2, 4 e 72 h pós-PCR e comparados com um grupo controle.

O **segundo capítulo** teve como objetivo compreender como a hipotermia terapêutica modifica marcadores de estresse oxidativo e dano neuronal em pacientes pós-PCR. Esta fase do estudo teve caráter observacional, realizada no Hospital Nossa Senhora da Conceição, em Porto Alegre-Brasil. Foram avaliados no sangue de pacientes tratados e não-tratados com a hipotermia terapêutica marcadores dano oxidativo e neuronal, além da atividade de enzimas antioxidantes 6, 12, 36 e 72 h após o evento da PCR. Também foram acompanhados nesses pacientes outros parâmetros clínicos e bioquímicos, assim como a sobrevivência dos pacientes em longo prazo, 3 anos pós-PCR.

3.1 Objetivos específicos

Capítulo I:

- a. Avaliar a disfunção miocárdica pós-PCR, através da avaliação do volume de ejeção do ventrículo esquerdo, do débito cardíaco e da fração de ejeção 2, 4 e 72 h pós-PCR em modelo experimental de parada cardíaca, e compará-los a um grupo controle.
- b. Avaliar os marcadores de dano oxidativo hs-cTnT, 8-OHG, IsoP, GSH, ADMA e DDAH 2, 4 e 72 h pós-PCR em modelo experimental de parada cardíaca, e compará-los a um grupo controle.
- c. Relacionar os marcadores de dano e função miocárdicos com os marcadores de estresse oxidativo.

Capítulo II:

- a. Avaliar os níveis do marcador de dano neuronal S100B e a atividade da enzima geradora do radical livre $O_2^{\cdot-}$ XO no soro de pacientes pós-PCR 6, 12, 36 e 72 h após a reanimação, em pacientes tratados e não-tratados com hipotermia terapêutica.
- b. Avaliar os níveis dos marcadores de dano oxidativo em lipídios MDA no soro, e de dano oxidativo em proteínas (grupos carbonila) no plasma, de pacientes pós-PCR 6, 12, 36 e 72 h após a reanimação, em pacientes tratados e não-tratados com hipotermia terapêutica.
- c. Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx, GST e consumo de H_2O_2 em eritrócitos e da PON-1 no soro de pacientes pós-PCR 6, 12, 36 e 72 h após a reanimação, em pacientes tratados e não-tratados com hipotermia terapêutica.

d. Avaliar os níveis indiretos de NO no plasma e eritrócitos, assim como os níveis de Vitamina C no soro de pacientes pós-PCR 6, 12, 36 e 72 h após a reanimação, em pacientes tratados e não-tratados com hipotermia terapêutica.

e. Avaliar a sobrevivência dos pacientes em longo prazo durante 3 anos após a PCR e relacionar aos parâmetros de dano neuronal e oxidativo.

4. CAPÍTULO I

Artigo publicado na revista *Journal of Biomedical Science*, 2014, 21:70. doi:10.1186/s12929-014-0070-6. A doutoranda foi responsável pela análise dos dados, pela análise estatística e redação do artigo.

Relationship between post-cardiac arrest myocardial oxidative stress

and myocardial dysfunction in the rat

Fernanda Schäfer Hackenhaar^{1,2} - fernanda.hackenhaar@ufrgs.br

Francesca Fumagalli² - francesca.fumagalli@marionegri.it

Giovanni LiVolti^{3,4} - livolti@unict.it

Valeria Sorrenti⁵ - sorrenti@unict.it

Ilaria Russo² - ilaria.russo@marionegri.it

Lidia Staszewsky² - lidia.staszewsky@marionegri.it

Serge Masson² - serge.masson@marionegri.it

Roberto Latini² - roberto.latini@marionegri.it

Giuseppe Ristagno² - gristag@gmail.com

¹Department of Biophysics, Universidade Federal of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milan, Italy

³Department of Clinical and Molecular Biomedicine, University of Catania, Italy

⁴Euromediterranean Institute of Science and Technology, Palermo, Italy

⁵Department of Drug Sciences, University of Catania, Italy

Address for correspondence:

Giuseppe Ristagno, MD, PhD. Department of Cardiovascular Research. IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri". Via La Masa 19 - 20156, Milan, Italy. Tel. +39 02 39014613; Fax +39 02 33200049; Email. gristag@gmail.com

Abstract

Background. Reperfusion after resuscitation from cardiac arrest (CA) is an event that increases reactive oxygen species production leading to oxidative stress. More specifically, myocardial oxidative stress may play a role in the severity of post-CA myocardial dysfunction. This study investigated the relationship between myocardial oxidative stress and post-CA myocardial injury and dysfunction in a rat model of CA and cardiopulmonary resuscitation (CPR). Ventricular fibrillation was induced in 26 rats and was untreated for 6 min. CPR, including mechanical chest compression, ventilation, and epinephrine, was then initiated and continued for additional 6 min prior to defibrillations. Resuscitated animals were sacrificed at two h (n=9), 4 h (n=6) and 72 h (n=8) following resuscitation, and plasma collected for assessment of: high sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT), as marker of myocardial injury; isoprostanes (IsoP), as marker of lipid peroxidation; and 8-hydroxyguanosine (8-OHG), as marker of DNA oxidative damage. Hearts were also harvested for measurement of tissue IsoP and 8-OHG. Myocardial function was assessed by echocardiography at the corresponding time points. Additional 8 rats were not subjected to CA and served as baseline controls.

Results. Compared to baseline, left ventricular ejection fraction (LVEF) was reduced at 2 and 4 h following resuscitation ($p < 0.01$), while it was similar at 72 h. Inversely, plasma hs-cTnT increased, compared to baseline, at 2 and 4 h post-CA ($p < 0.01$), and then recovered at 72 h. Similarly, plasma and myocardial tissue IsoP and 8-OHG levels increased at 2 and

4 h post-resuscitation ($p < 0.01$ vs. baseline), while returned to baseline 72 h later. Myocardial IsoP were directly related to hs-cTnT levels ($r = 0.760$, $p < 0.01$) and inversely related to LVEF ($r = -0.770$, $p < 0.01$). Myocardial 8-OHG were also directly related to hs-cTnT levels ($r = 0.409$, $p < 0.05$) and inversely related to LVEF ($r = -0.548$, $p < 0.01$).

Conclusions. The present study provides evidence that lipid peroxidation and DNA oxidative damage in myocardial tissue are closely related to myocardial injury and LV dysfunction during the initial hours following CA.

Keywords: cardiopulmonary resuscitation; myocardial injury; oxidative damage; isoprostanes; 8-hydroxyguanosine.

Background

The prognosis of cardiac arrest after cardiopulmonary resuscitation (CPR) remains poor, with more than 70% of resuscitated patients dying within 72 h after return of spontaneous circulation (ROSC), due to the well described post-cardiac arrest syndrome [1]. Severe heart contractile failure due to post-resuscitation myocardial dysfunction has been implicated as the most important mechanism accounting for early death after ROSC [2].

Due to the complexity and interplay of events occurring during cardiac arrest and after ROSC, mechanisms involved in post-resuscitation myocardial dysfunction are not completely understood, and new injury pathways have been described [3]. Cardiac arrest is a global ischemic event followed by a whole body reperfusion when ROSC is achieved. Indeed, ischemia-reperfusion (I/R) is a process characterized by reactive oxygen species (ROS) generation, which starts during ischemia and is further exacerbated with the sudden return of oxygenated blood to the tissues after ROSC [4,5]. This increase in ROS production leads to oxidation of cell macromolecules, such as lipids, proteins, and possibly DNA, in a process overall named oxidative stress [6,7]. The oxidative stress events are recognized to participate in processes leading to acute inflammatory response, cell damage, mitochondrial dysfunction, decrease in nitric oxide (NO) availability, and ultimately cell apoptosis and death [4-6,8-11]. In the heart, these events may impair the normal function of cardiomyocytes, contributing to the severity of post-cardiac arrest myocardial dysfunction and may represent a future target for new therapeutic interventions [4]. Indeed, a recent experimental study showed that administration of an antioxidant after ROSC, i.e. ascorbic acid, was able to reduce lipid peroxidation, limiting myocardial injury and improving myocardial dysfunction and survival [11].

There are no published studies comprehensively assessing the relations over time between different markers of oxidative stress in plasma and myocardium, cardiac troponins (cTn) and left ventricular (LV) function. The aim of this study was to investigate the severity of myocardial oxidative stress following resuscitation in a rat model of cardiac arrest and CPR and its relationship with the severity of post-cardiac arrest myocardial injury and dysfunction. We hypothesized that myocardial oxidative injury may contribute to the severity of post-cardiac arrest myocardial injury and dysfunction.

Methods

Procedures involving animals and their care were in compliance with national (D.L. n. 116, G.U., suppl. 40, 18 February 1992, Circolare no. 8, G.U., 14 Luglio 1994) and international laws and policies (EEC Council Directive 86/609, OJL 358, 1, December 12, 1987; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, US National Research Council, 1996). Approvals of the studies were obtained by the local institutional review board committee and governmental institution.

Animal preparation

Thirty-four male Sprague-Dawley rats weighing 470 ± 26 g were fasted overnight except for free access to water. The details of the animal preparation were published previously [3]. In brief, the animals were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg), and additional doses (10 mg/kg) were administered at intervals of approximately 1 h or when required to maintain anesthesia. The trachea was orally intubated with a 14-gauge cannula. A PE-50 catheter (Becton Dickinson, FranklinLakes, NJ) was advanced into the descending aorta from the left femoral artery for measurement of arterial pressure and sampling arterial blood. Through the left external jugular vein, another PE-50 catheter was advanced into the right atrium for measurement of right atrial pressures. Aortic and

right atrial pressures were measured with reference to the mid chest with high-sensitivity transducers. A 3-F PE catheter (model C-PMS-301J, Cook Critical Care, Bloomington, IN) was advanced through the right external jugular vein into the right atrium. A pre-curved guide wire supplied with the catheter was then advanced through the catheter into the right ventricle and confirmed by endocardial electrocardiogram for inducing ventricular fibrillation (VF). All of the catheters were flushed intermittently with saline containing 2.5 IU/mL of bovine heparin. A conventional lead II electrocardiogram (ECG) was continuously monitored. Temperature was continuously monitored with the aid of a rectal probe and maintained at 37 ± 0.5 °C throughout the experiment.

Experimental procedures

Fifteen minutes prior to inducing VF, baseline measurements were obtained and mechanical ventilation was initiated with an inspired FiO_2 of 0.21. VF was electrically induced with progressive increases in 60-Hz current to a maximum of 4 mA delivered to the right ventricular endocardium. The current flow was continued for 3 min to prevent spontaneous defibrillation. Mechanical ventilation was stopped after the onset of VF. Precordial compression was begun after 6 min of untreated VF with a pneumatically driven mechanical chest compressor as previously described [3]. Coincident with the start of precordial compression, animals were mechanically ventilated at a frequency of 50/min with a tidal volume 0.6 ml/100g and a FiO_2 of 1.0. Precordial compression was maintained at a rate of 200/min with equal compression-relaxation duration (i.e., 50% duty cycle) and a depth of compression equal to 25% of the animal's antero-posterior chest diameter. Epinephrine (0.02 mg/kg) was injected into the right atrium 2 min after the start of precordial compression. After 6 min of CPR, resuscitation was attempted with up to three 2 Joule defibrillations (CodeMaster XL, Philips Heartstream, Seattle, WA). Successful resuscitation was defined as the return of supraventricular rhythm with a mean aortic

pressure (MAP) > 50 mm Hg for a minimum of 5 min. Following resuscitation, animals were monitored for 4 h. All the catheters and the endotracheal tubes were then removed. The animals were returned to their cages and were observed for up to 3 days after resuscitation. Animals were sacrificed with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (150 mg/kg) at different intervals: baseline, before cardiac arrest; 2 h post-resuscitation; 4 h post-resuscitation; and 72 h post-resuscitation. Plasma was withdrawn for biochemical analyses. Blood was collected into EDTA-tubes and centrifuged for 15 min at 3000 rpm at 4 °C. Plasma samples were then stored at -80 °C. The heart was quickly removed from the thoracic cavity, blotted and frozen at -80 °C for further biochemistry.

Measurements

Aortic and right atrial pressures, and ECG were continuously recorded on a personal computer-based data acquisition system supported by CODAS hardware and software (DataQ, Akron, OH). Coronary perfusion pressure (CPP) was calculated as the difference between aortic and time-coincident right atrial pressures [3]. Transthoracic echocardiography was performed at 3 and 72 h after resuscitation using SSD-5500 echo machine (Aloka, Tokyo, Japan) equipped with a 13 MHz linear array transducer at high frame rate imaging (102 Hz) and a 7.5 MHz phased array probe for pulsed-wave, color and tissue Doppler imaging. Echocardiographic images were obtained from parasternal short and long-axis views and from apical views. End-diastolic and end-systolic wall thicknesses, systolic wall thickening, LV internal dimensions and fractional shortening were measured and calculated. LV volumes and ejection fraction (EF) were calculated by the modified single plane Simpson's rule from the parasternal long-axis view as previously reported [3]. Aortic outflow velocities were measured from a 5 apical chamber view by pulsed-wave Doppler and LV cardiac output (CO) and stroke volume (SV) were calculated [3].

Plasma high sensitivity cTnT (hs-cTnT) levels were assessed with an electrochemiluminescence assay (ECLIA, Elecsys 2010 analyzer, Roche Diagnostics, Germany). Isoprostanes (IsoP) and 8-hydroxyguanosine (8-OHG) were assessed by commercially available ELISA Kits (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instruction. Plasma reduced glutathione (GSH) was measured by a spectrophotometric assay, in accordance with the method of Hu, as previously reported [12]. Briefly, the method was based on the reaction of thiol groups with 2,2-dithio-bis-nitrobenzoic acid (DTNB) in absolute ethanol to give a colored compound absorbing at $\lambda=412$ nm. Removal of proteins was performed with an excess of absolute ethanol, followed by centrifugation at 3000 g for 10 min at room temperature. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentration was also measured by a commercially available ELISA Kit (DLD Diagnostika, Hamburg, Germany). For assessment of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) Tissues were homogenized in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5, containing 2 mM mercapto-ethanol and protease inhibitor cocktail (1:1000). Homogenates were centrifuged at 5000 g for 60 min, and supernatants were collected for DDAH enzyme activity assay. DDAH enzyme activity was assayed by determining L-citrulline formation in a 96-well microtiter plate. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme catalyzing the formation of 1 mol L-citrulline/min at 37°C.

Statistical analysis

One sample Kolmogorov–Smirnov Z test was used to confirm normal distribution of the data. Comparisons among time-based measurements within groups were performed by one-way ANOVA with Fisher's LSD post-hoc test. Linear correlations between parametric variables were calculated using the Pearson correlation coefficient. Spearman test was performed for the non-parametric variable correlation analyses. Data are reported as mean \pm SEM, except for hs-cTnT, presented as median [25-75 percentile]. A 2-tail $p < 0.05$ was

considered as statistically significant. The analyses were performed using GraphPad Prism 6.

Results

A total of 34 rats were included in the study. Eight control rats were not subjected to cardiac arrest and served as baseline, while the other 26 underwent cardiac arrest and CPR. Among the 26 cardiac arrest rats, 23 were successfully resuscitated (88%) and were assigned to be sacrificed at 2 h (n = 8), 4 h (n = 9), and 72 h (n = 8) after resuscitation. No differences in body weight and number of defibrillations and duration of CPR prior to ROSC were observed among the groups (Table 1). Among the 8 rats undergoing to 72 h of post-resuscitation observation, 5 (63%) survived till the end of the observational period.

Table 1. Resuscitation outcome

	Baseline (n=8)	PR 2h (n=9)	PR 4h (n=6)	PR 72h (n=8)
Body Weight, g	475 ± 13	477 ± 7	472 ± 7	458 ± 6
Defibrillations to ROSC, n	—	4 ± 1	3 ± 1	2 ± 1
Time to ROSC, sec	—	396 ± 16	373 ± 10	360 ± 1

PR, post resuscitation; ROSC, return of spontaneous circulation.

Data shown as mean ± SEM.

Hemodynamics and myocardial function

Each rat developed a marked post-resuscitation myocardial dysfunction during the 4 h of observation, which regressed 72 h later. Indeed, heart rate was significantly reduced during the first 2 h post-resuscitation compared to baseline (Figure 1), while MAP and CPP remained decreased for the entire 4 h post-resuscitation (p<0.01 vs. baseline, Figure 1). Similarly to hemodynamics, LV end systolic volume and EF were also significantly decreased at 2 and 4 h post-resuscitation (p<0.01 vs. baseline), while returned to baseline 72 h later (Figure 2). Resuscitated rats also presented markedly reduced LV SV and CO (p<0.01 vs. baseline, Figure 2) at 2, 4, and 72 h post-resuscitation.

Changes observed in post-resuscitation myocardial function, expressed as LVEF, were paralleled by the concurrent changes in circulating levels of hs-cTnT (Table 2). Plasma levels of hs-cTnT, in fact, significantly increased at 2 and 4 h post-resuscitation ($p < 0.01$ vs. baseline), and then normalized at 72 h (Table 2). Hs-cTnT levels inversely correlated with LVEF ($r = -0.89$, $p < 0.01$).

Table 2. Circulating oxidative stress biomarkers and asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)

	Baseline (n=8)	PR 2h (n=9)	PR 4h (n=6)	PR 72h (n=8)
Plasma hs-cTnT, ng/L	61 [20-91]	3732 [3277-6218] **	3469 [2428-4930] *	44 [39-1610]
Plasma IsoP, pg/mL	235.6 ± 28.8	206.2 ± 14.9	306.6 ± 21.6 *	216.6 ± 30.0
Plasma 8-OHG, pg/mL	742.9 ± 79.3	1044.5 ± 71.1 *	914.9 ± 104.1	846.9 ± 14.7
Plasma GSH, µmol/mL	0.146 ± 0.030	0.099 ± 0.004	0.095 ± 0.013	0.136 ± 0.023
Plasma ADMA, µmol/L	0.767 ± 0.10	0.641 ± 0.07	0.468 ± 0.06 *	0.601 ± 0.07
Myocardial ADMA, nmol/mg prot	0.083 ± 0.01	0.052 ± 0.01	0.043 ± 0.01	0.080 ± 0.02
Myocardial DDAH, nmol/mg prot	77.5 ± 12.7	73.5 ± 7.2	79.0 ± 10.4	90.0 ± 12.8

PR, post resuscitation; 8-OHG, 8-hydroxyguanosine; hs-cTnT, high-sensitivity cardiac troponin T; IsoP, isoprostanes; GSH, reduced glutathione.

Parametric data are shown as mean ± SEM;

Non-parametric data are shown as median [25-75 percentile].

* $p < 0.05$ vs. Baseline; ** $p < 0.01$ vs. Baseline.

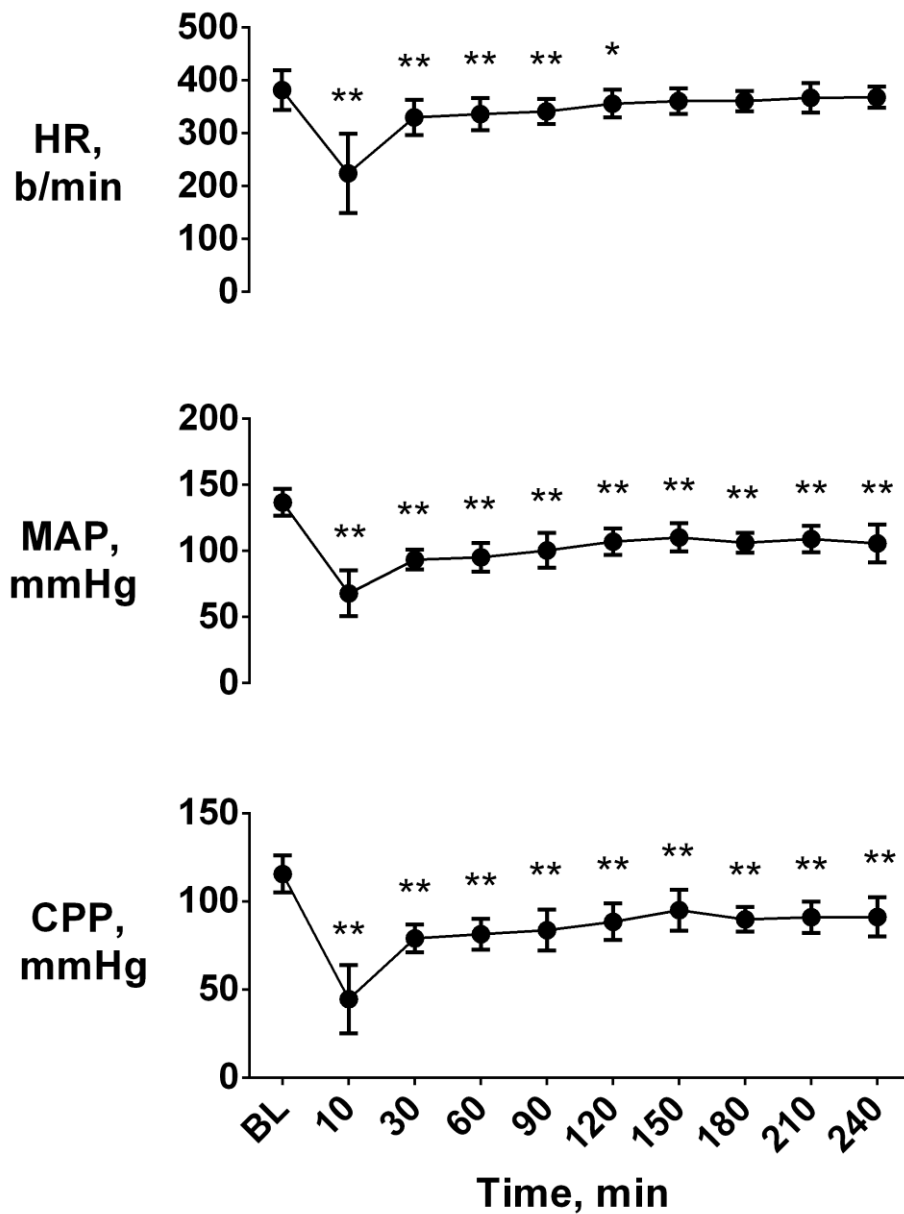
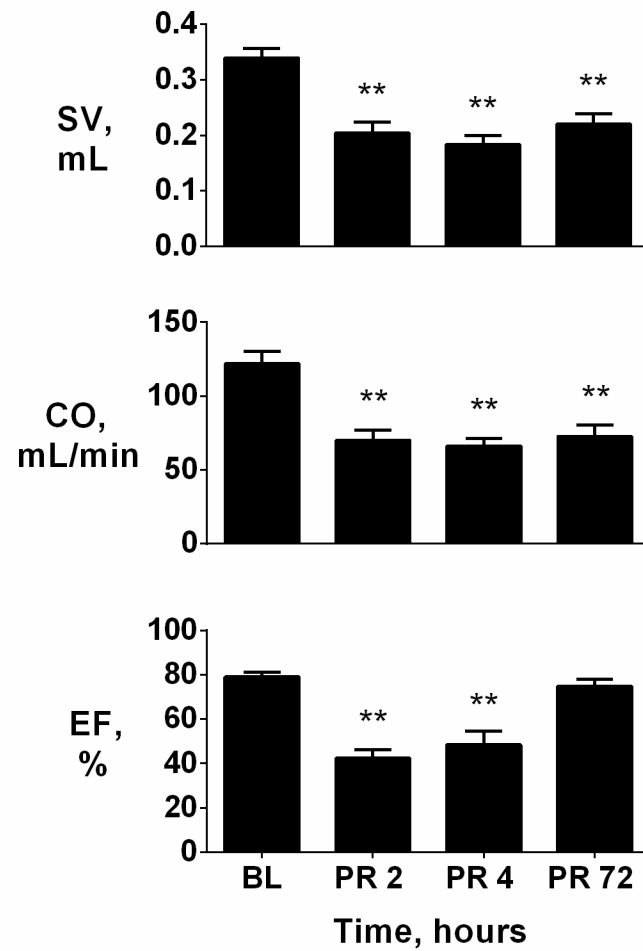


Figure 1. Hemodynamics.

Heart rate (HR), mean arterial pressure (MAP) and coronary perfusion pressure (CPP) at baseline (BL) and post-resuscitation. Data are shown as mean±SEM; *p<0.05 and**p<0.01 vs. BL.



	BL	PR 2	PR 4	PR 72
ESV, mL	0.57 ± 0.12	0.25 ± 0.04 *	0.26 ± 0.05 *	0.53 ± 0.14
EDV, mL	0.39 ± 0.02	0.43 ± 0.05	0.47 ± 0.06	0.28 ± 0.02

Figure 2. Myocardial function.

Left ventricle stroke volume (SV), cardiac output (CO) and ejection fraction (EF) at baseline (BL) and post-resuscitation (PR). The bottom table report data on left ventricle end systolic volume (ESV) and end diastolic volume (EDV). Data are shown as mean±SEM; *p<0.05 and **p<0.01 vs. BL.

Oxidative stress biomarkers

Plasma levels of IsoP, a marker of lipid peroxidation, significantly increased at 4 h post-resuscitation and recovered 72 h later ($p < 0.05$ vs. baseline, Table 2). Changes in myocardial tissue IsoP were more evident compared to those in plasma (Figure 3). Myocardial IsoP markedly increased at 2 and 4 h post-resuscitation ($p < 0.01$ vs. baseline, Figure 3), while levels returned to baseline values 72 h later. Myocardial IsoP were directly related to plasma hs-cTnT ($r = 0.760$, $p < 0.0001$, Figure 3) and inversely related to LV EF ($r = -0.770$, $p < 0.0001$, Figure 3).

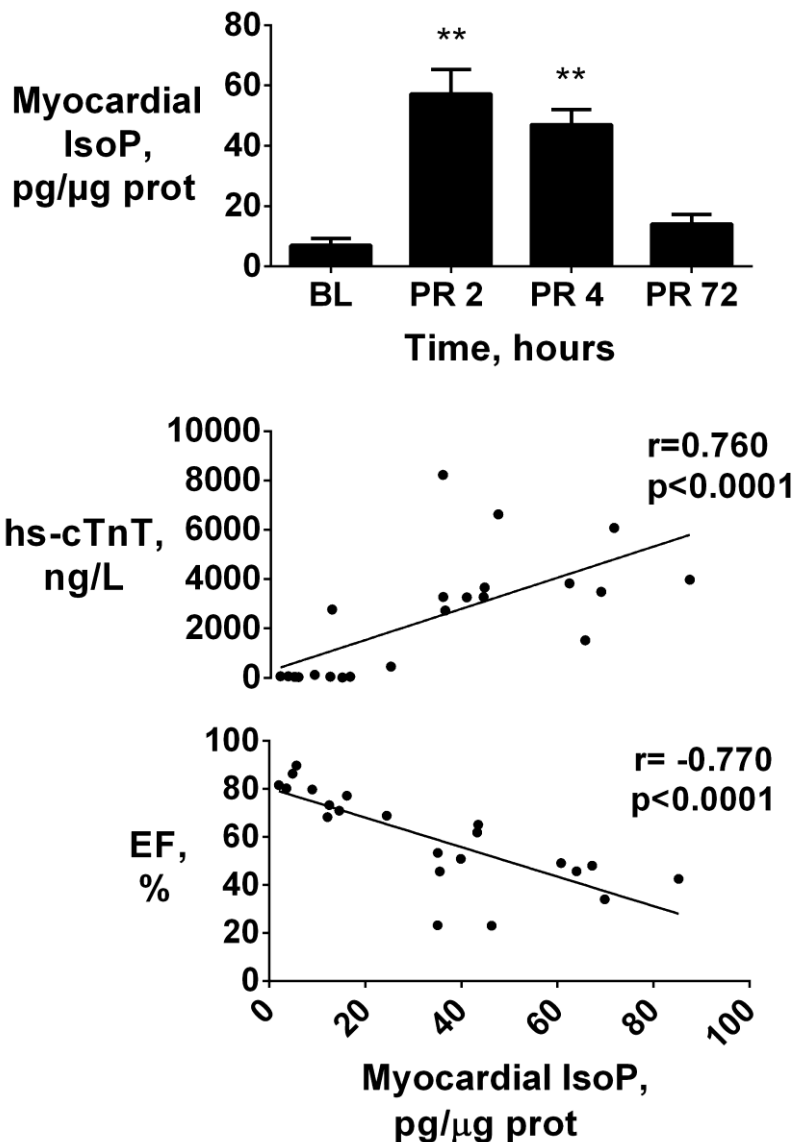


Figure 3. Myocardial isoprostanes vs. myocardial injury and function.

Upper: Myocardial isoprostanes (IsoP) levels at baseline (BL) and post resuscitation (PR), reported as mean \pm SEM, ** $p < 0.01$ vs. BL. *Bottom:* relation between IsoP and high-sensitivity cardiac troponin (hs-cTnT) and left ventricle ejection fraction (LVEF).

Plasma levels of 8-OHG, a marker of DNA damage, significantly increased at 2 h post-resuscitation and recovered within the following 2 h of observation ($p < 0.05$ vs. baseline, Table 2). Changes in myocardial tissue 8-OHG were more evident compared to those in plasma (Figure 4). Myocardial 8-OHG markedly increased at 2 and 4 h post-resuscitation ($p < 0.01$ vs. baseline, Figure 4), while levels returned to baseline values 72 h later. Myocardial 8-OHG were directly related to plasma hs-cTnT ($r = 0.409$, $p < 0.05$, Figure 4) and inversely related to LVEF ($r = -0.548$, $p < 0.01$, Figure 4).

Plasma levels of GSH slightly decreased at 2 and 4 h post-resuscitation (p not significant) and recovered 72 h later (Table 2).

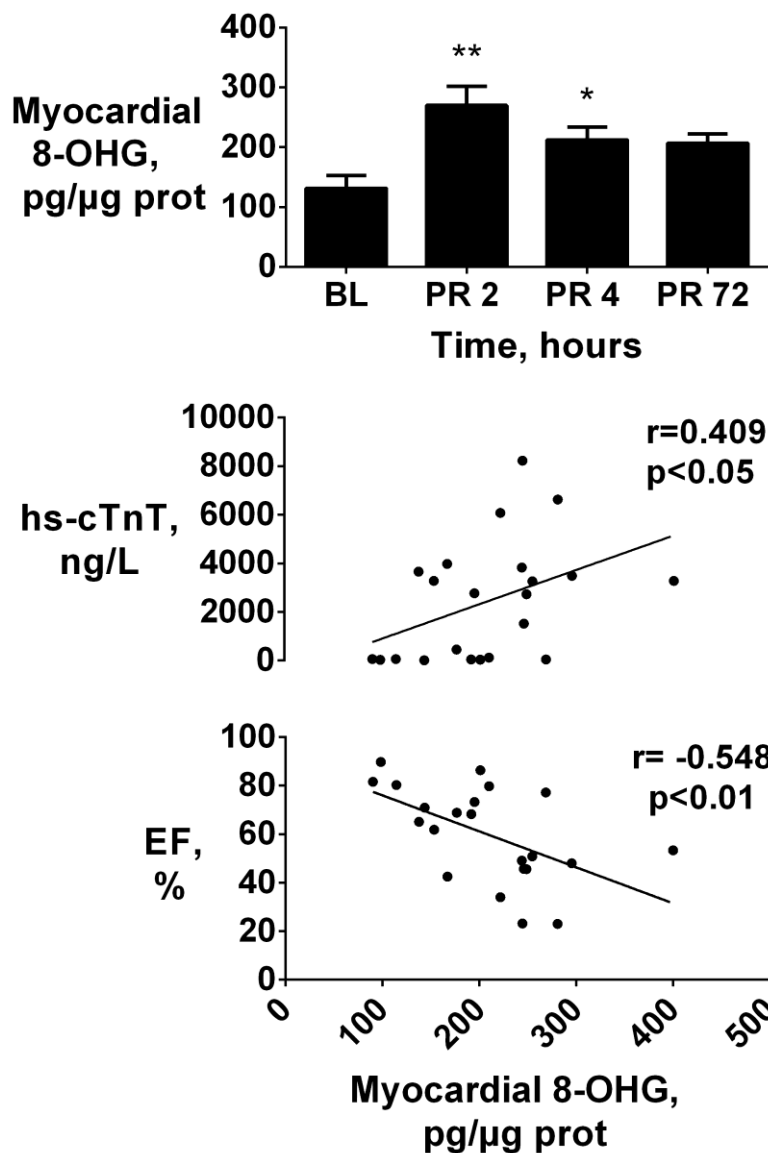


Figure 4. Myocardial 8-hydroxyguanosine vs. myocardial injury and function.

Upper: Myocardial 8-hydroxyguanosine (8-OHG) levels at baseline (BL) and post resuscitation (PR), reported as mean \pm SEM, ** $p<0.01$ and * $p<0.05$ vs. BL. *Bottom:* relation between 8-OHG and high-sensitivity cardiac troponin (hs-cTnT) and left ventricle ejection fraction (EF).

ADMA, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), was assayed in plasma and myocardial tissue. Plasma levels of ADMA were significantly decreased at 4 h post-resuscitation compared to baseline ($p < 0.05$, Table 2). Similarly, there was a trend towards decreases in myocardial ADMA levels during the 4 h of post-resuscitation ($p = 0.05$ vs. baseline, Table 2), while it recovered to baseline values 72 h later.

Decreases in myocardial ADMA were paralleled by concurrent changes in myocardial DDAH, the enzyme that degrades ADMA (Table 2). However, only a trend towards increases in myocardial DDAH was observed at 4 and 72 h post-resuscitation (p not significant, Table 2).

Discussion

The present study describes the entity of circulating and myocardial tissue levels of oxidative stress markers during the initial hours post-resuscitation and it suggests a contribution of oxidative damage to the severity of post-cardiac arrest myocardial injury and dysfunction. Indeed, IsoP and 8-OHG levels in the myocardial tissue significantly increased at 2 and 4 h post-resuscitation, and these increases related to the increased hs-cTnT levels, a specific marker of myocardial injury, and to the impaired LVEF, a marker of myocardial dysfunction. Plasma levels of circulating IsoP and 8-OHG were also significantly increased after resuscitation, indicating a concurrent condition of whole body oxidative stress.

Post-cardiac arrest myocardial dysfunction contributes to the early deaths after resuscitation from cardiac arrest [2]. It is characterized by a compromised LV systolic function with low CO and arterial pressure. In patients who survive, this myocardial dysfunction is transient and fully recovers during the following 2-3 days after ROSC [2]. cTn are regulatory proteins belonging to the heart's contractile apparatus that regulates the

calcium-mediated interaction of actin and myosin. Accordingly, cTn release is commonly observed after resuscitation from cardiac arrest [13]. The release of cTn from the myocardium might reflect an ongoing myocyte cell death as well as other events, i.e. myocyte stretching with transient loss of cell membrane integrity, and is related to the severity of myocardial dysfunction [13, 14]. In our study, we observed significant reductions in post-cardiac arrest LV EF, at 2 and 4 h following ROSC, with a subsequent recovery 72 h later. A strong relationship between LV EF and circulating hs-cTnT was confirmed at different time points following ROSC. Normal LV function at 72 h post ROSC indicates that myocardial viability was preserved even in the presence of previous hs-cTnT degradation. This suggests that post-resuscitation myocardial dysfunction is largely reversible in the present model.

ROS formation, including free radical superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical, occurs in low levels under physiological conditions, but it is exacerbated as a consequence of I/R injury [5-7]. Under this condition of I/R, ROS are produced in myocardial and other tissues by several mechanisms, involving actions of xanthine oxidase, NOS, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase [15, 16, 3]. Consequently, this exacerbated ROS production creates an imbalance between oxidant and antioxidant mechanisms inside the cells, which may contribute to post-cardiac arrest myocardial dysfunction [17]. Inflammatory cell infiltration in myocardial tissue is another well-known process after I/R that contributes to ROS generation, leading to apoptosis of cardiomyocytes [4]. Finally, mitochondria play also a crucial role in increasing ROS generation after I/R, due to an uncoupling of electron transport chain after reperfusion [18]. The consequent ROS increase in the mitochondria, in addition to the reperfusion-related calcium overload, further activates the apoptotic cell death pathways [19,20].

In our study we assessed oxidative stress after CPR by measuring markers of lipid oxidation, namely IsoP, and a marker of DNA oxidation, namely 8-OHG. IsoP are stable products of arachidonic acid oxidation and are released from cells undergoing oxidative stress [20]. Indeed, two- to three-fold increases in IsoP have been previously reported in plasma after resuscitation from cardiac arrest in pigs, and in cardiac tissue after myocardial I/R in mice [6, 22]. IsoP present important biological activity [6]. The oxidation of these lipids, in fact, impairs cell membrane stability, leading to altered permeability, endothelial dysfunction, and consequent cell damage [5, 23]. In a model of myocardial I/R in rats, pretreatment with F-isoprostane induced a five-fold increased endothelin-1 release, impaired LV developed pressure, and increased infarct size compared to control animals [23]. Indeed, in our experiment, both plasma and myocardial tissue IsoP significantly increased after resuscitation. Nevertheless, myocardial IsoP increase was more evident compared to plasma increase and highly correlated with hs-cTnT releases and LV dysfunction over time.

8-OHG is a specific biomarker of oxidative damage to DNA [24, 25]. Similarly to our results, increases in urinary 8-OHG have been reported in patients with acute myocardial infarction, with peak levels at 4 h after reperfusion therapy and a return to baseline levels within 24 h [26]. Whether oxidative stress-related DNA damage and altered gene expression may contribute to LV dysfunction and remodeling after an ischemic event is not clear [27]. A report in a rat model of I/R demonstrated increased 8-OHG in nuclei of cardiomyocytes after reperfusion, which, however, seemed not to have any relation with the altered LV function [8]. Other studies, instead, reported a correlation between the oxidative damage to mitochondrial DNA and the severity of LV dilatation and reduced contractility in mice subjected to myocardial infarction [27]. Similarly to our results, high serum and urinary levels of 8-OHG were observed in patients with heart failure and further

increases in 8-OHG occurred for higher New York Heart Association (NYHA) functional class, such that 8-OHG was suggested as prognostic tool for risk stratification in these patients [24, 25]. To the best of our knowledge, this is the first study relating 8-OHG to post-cardiac arrest LV dysfunction. Our results suggest a relationship between 8-OHG and myocardial injury and function, similarly to IsoP. Increase in post-resuscitation 8-OHG levels were, however, of lesser extent compared to those in IsoP.

Oxidative stress following cardiac arrest is a systemic event, such that oxidative stress biomarkers are generated in all tissues, as products of the oxidation of molecules present in every cell types [26, 28]. Such a condition of whole body post-resuscitation oxidative stress is indeed supported by the significant increases in plasma IsoP and 8-OHG together with the concurrent reduction in plasma GSH, a known endogenous inactivator of oxygen-derived highly reactive species [12]. Consequently, in contrast to plasma levels, dosage of oxidative stress biomarkers directly in myocardial tissue was a more reliable marker for myocardial damage, and better represented the time-dependent oxidative stress in our study. Myocardial IsoP and 8-OHG increases were directly related with hs-cTnT and inversely related with LVEF. Whether the observed relation between tissue IsoP and 8-OHG and established markers of cardiac injury such as cTn and LVEF, is causal needs to be further investigated.

Accordingly, our findings indicate a possible contribution of oxidative stress to post-cardiac arrest myocardial injury and dysfunction. After I/R, endothelial dysfunction and inhibition of NOS with reduced NO availability are commonly observed, due to oxidative stress [10]. NO is an endothelium-derived vasoactive factor produced by NOS, that plays important roles in modulating coronary vascular tone and tissue perfusion [29]. NO, however, is also known to be able to react with free radical superoxide producing peroxynitrite, a more powerful oxidating reactive specie, which worsens tissue damage by

protein nitration [30]. ADMA is an endogenous inhibitor of NOS activity, present in high concentration inside the endothelial cells [31,32]. In a recent study in coronary artery bypass grafting patients, cardioplegic arrest was associated with decreased plasma levels of ADMA; the mechanisms involved in this process remained, however, unexplained [33]. Similarly, in our study, decreases in both plasma and myocardial tissue levels of ADMA after cardiac arrest were observed and paralleled reductions in LVEF and increases in hs-cTnT. Decreases in myocardial ADMA were paralleled and explained by concurrent increases in its degrading enzyme DDAH [32]. It can be hypothesized that these ADMA decreases may potentially exacerbate post-cardiac arrest myocardial dysfunction. Decreases in ADMA may, in fact, lead to decrease in NOS inhibition and consequent greater NO production and nitrosative stress [34]. Moreover, besides inhibiting NO synthesis, ADMA can directly induce oxidative stress and cell apoptosis, and participate in inflammatory reactions [32,35,36]. Indeed, by inhibiting endothelial NOS, ADMA might increase the risk of vascular inflammation and thrombosis, such that elevated plasma ADMA has been reported to be a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality in patients with cardiovascular disease [32]. Thus, we cannot exclude that decrease in ADMA may, instead, reflect an adaptive change aimed to protect from oxidative stress.

Some limitations need to be taken into account when interpreting our results. First, the study was performed in healthy animals with no previous myocardial damage. Second, this study is a descriptive report and no direct mechanisms assessing the connection between oxidative stress and myocardial damage and dysfunction were shown, nor effects from inhibition of oxidative stress pathways on post-resuscitation myocardial dysfunction. Accordingly, further interventional experimental studies are underway. Nevertheless, the results demonstrated the clear relationship between oxidative stress and post-resuscitation hs-cTnT release and LV dysfunction. Moreover, both circulating and tissue levels of

oxidative stress markers have been reported overtime post-resuscitation, providing new insights in the time-course of these biomarkers.

Conclusions

The present study in a rat model of CPR demonstrated the possible contribution of oxidative damage to post-cardiac arrest syndrome. It provided evidence that lipid peroxidation and DNA oxidative damage in myocardial tissue are closely related to myocardial injury, represented by hs-cTnT release, and LV dysfunction, represented by reduced EF, during the initial hours following resuscitation from cardiac arrest.

List of abbreviations

8-OHG, 8-hydroxyguanosine

ADMA, asymmetric dimethylarginine

CO, cardiac output

CPP, coronary perfusion pressure

CPR, cardiopulmonary resuscitation

cTn, cardiac troponins

DDAH, dimethylarginine dimethylaminohydrolase

ECG, electrocardiogram

EF, ejection fraction

GSH, reduced glutathione

hs-cTnT, high sensitivity cardiac troponin

I/R, ischemia/reperfusion

IsoP, isoprostanes

LV, left ventricle

MAP, mean arterial pressure

NO, nitric oxide

ROS, reactive oxygen species

ROSC, return of spontaneous circulation

SV, stroke volume

VF, ventricular fibrillation

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Authors' contributions

FSH participated in the study design, performed the statistical analysis, interpreted the results, and drafted the manuscript; FF participated in the study design and carried out all the *in vivo* studies; GLV participated in the study design and in the oxidative stress biomarker measurements, and helped to draft the manuscript; VS carried out the oxidative stress biomarker measurements; IR carried out the echocardiographic exams; LS participated in echocardiographic exams and helped to draft the manuscript; SM participated in the plasma cardiac troponins measurements, in the interpretation of the results, and helped to draft the manuscript; RL participated in the study design and helped to draft the manuscript; GR conceived the study and participated in the statistical analysis, interpretation of the results, and drafting of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

First author FSH received a support from government program in Brazil “Ciência Sem Fronteiras” for a 6-month fellowship in the Department of Cardiovascular research, IRCCS-Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri”, Italy, under the post-graduation program “Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular”, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

The authors thank Drs. Tarcisio Vago and Teresa Letizia, Laboratory of Endocrinology, Ospedale Luigi Sacco, Milan, Italy, for assaying hs-cTnT.

References

- [1] Wang HE, Devlin SM, Sears GK, Vaillancourt C, Morrison LJ, Weisfeldt M, Callaway CW, ROC Investigators: **Regional variations in early and late survival after out-of-hospital cardiac arrest.** *Resuscitation* 2012, **83**:1343-1348.
- [2] Laurent I, Monchi M, Chiche JD, Joly LM, Spaulding C, Bourgeois B, Cariou A, Rozenberg A, Carli P, Weber S, Dhainaut JF: **Reversible myocardial dysfunction in survivors of out-of-hospital cardiac arrest.** *J Am Coll Cardiol* 2002, **40**:2110–2116.
- [3] Ristagno G, Fries M, Brunelli L, Fumagalli F, Bagnati R, Russo I, Staszewsky L, Masson S, Li Volti G, Zappalà A, Derwall M, Brücken A, Pastorelli R, Latini R: **Early kynurenine pathway activation following cardiac arrest in rats, pigs, and humans.** *Resuscitation* 2013,**84**:1604-1610.
- [4] Zhang YS, He L, Liu B, Li NS, Luo XJ, Hu CP, Ma QL, Zhang GG, Li YJ, Peng J: **A novel pathway of NADPH oxidase/vascular peroxidase 1 in mediating oxidative injury following ischemia–re perfusion.** *Basic Res Cardiol* 2012,**107**:266.
- [5] Levraut J, Iwase H, Shao ZH, Vanden Hoek TL, Schumacker PT: **Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003,**284**:H549-558.
- [6] Celes MR, Torres-Dueñas D, Prado CM, Campos EC, Moreira JE, Cunha FQ, Rossi MA: **Increased sarcolemmal permeability as an early event in experimental**

septic cardiomyopathy: a potential role for oxidative damage to lipids and proteins. *Shock* 2010,**33**:322-331.

[7] Idris AH, Roberts LJ 2nd, Caruso L, Showstark M, Layon AJ, Becker LB, Vanden Hoek T, Gabrielli A: **Oxidant injury occurs rapidly after cardiac arrest, cardiopulmonary resuscitation, and reperfusion.** *Crit Care Med* 2005,**33**:2043-2048.

[8] Inafuku H, Kuniyoshi Y, Yamashiro S, Arakaki K, Nagano T, Morishima Y, Kise Y: **Determination of oxidative stress and cardiac dysfunction after ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts.** *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2013,**19**:186-194.

[9] Kern KB, Berg RA, Hilwig RW, Larson DF, Gaballa MA: **Myocardial cytokine IL-8 and nitric oxide synthase activity during and after resuscitation: Preliminary observations in regards to post-resuscitation myocardial dysfunction.** *Resuscitation* 2008,**77**:401-409.

[10] Witting PK, Rayner BS, Wu BJ, Ellis NA, Stocker R: **Hydrogen peroxide promotes endothelial dysfunction by stimulating multiple sources of superoxide anion radical production and decreasing nitric oxide bioavailability.** *Cell Physiol Biochem* 2007,**20**:255-268.

[11] Tsai MS, Huang CH, Tsai CY, Chen HW, Cheng HJ, Hsu CY, Chang WT, Chen WJ: **Combination of intravenous ascorbic acid administration and hypothermia after resuscitation improves myocardial function and survival in a ventricular fibrillation cardiac arrest model in the rat.** *Acad Emerg Med* 2014,**21**:257-265.

[12] Li Volti G, Galvano F, Frigiola A, Guccione S, Di Giacomo C, Forte S, Tringali G, Caruso M, Adekoya OA, Gazzolo D: **Potential immunoregulatory role of heme**

oxygenase-1 in human milk: a combined biochemical and molecular modeling approach. *J Nutr Biochem* 2010,**21**:865-871.

[13] Dumas F, Manzo-Silberman S, Fichet J, Mami Z, Zuber B, Vivien B, Chenevier-Gobeaux C, Varenne O, Empana JP, Pène F, Spaulding C, Cariou A: **Can early cardiac troponin I measurement help to predict recent coronary occlusion in out-of-hospital cardiac arrest survivors?** *Crit Care Med* 2012,**40**:1777-1784.

[14] Metzler B, Hammerer-Lercher A, Jehle J, Dietrich H, Pachinger O, Xu Q, Mair J: **Plasma cardiac troponin T closely correlates with infarct size in a mouse model of acute myocardial infarction.** *Clin Chim Acta* 2002,**325**:87-90.

[15] Kaul A, Misra, MK, Sethi R: **Evaluation of the roles of adenosine deaminase and xanthine oxidase in reperfusion injury in patients with myocardial infarction.** *Clin Chim Acta* 2007,**380**:225-227.

[16] Dumitrescu C, Biondi R, Xia Y, Cardounel AJ, Druhan LJ, Ambrosio G, Zweier JL: **Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH₄) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH₄.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007,**104**:15081-15086.

[17] Andre L, Fauconnier J, Reboul C, Feillet-Coudray C, Meschin P, Farah C, Fouret G, Richard S, Lacampagne A, Cazorla O: **Subendocardial increase in reactive oxygen species production affects regional contractile function in ischemic heart failure.** *Antioxid Redox Signal* 2013,**18**:1009-1020.

[18] Makazan Z, Saini HK, Dhalla NS: **Role of oxidative stress in alterations of mitochondrial function in ischemic-reperfused hearts.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007,**292**:H1986-1994.

- [19] Thu VT, Kim HK, Long le T, Lee SR, Hanh TM, Ko TH, Heo HJ, Kim N, Kim SH, Ko KS, Rhee BD, Han J: **NecroX-5 prevents hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting the mitochondrial calcium uniporter.** *Cardiov Res* 2012,**94**:342-350.
- [20] Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J: **Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion.** *J Mol Cell Cardiol* 2000,**32**:197-208.
- [21] Labuschagne CF, van den Broek NJ, Postma P, Berger R, Brenkman AB: **A protocol for quantifying lipid peroxidation in cellular systems by F2-isoprostane analysis.** *PlosOne* 2013, **8**:e80935.
- [22] Hu C, Dandapat A, Chen J, Fujita Y, Inoue N, Kawase Y, Jishage K, Suzuki H, Sawamura T, Mehta JL: **LOX-1 deletion alters signals of myocardial remodeling immediately after ischemia–reperfusion.** *Cardiov Res* 2007,**76**:292-302.
- [23] Xia Z, Kuo KH, Godin DV, Walker MJ, Tao MC, Ansley DM: **15-F2t-isoprostane exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005,**289**:1366-1372.
- [24] Suzuki S, Shishido T, Ishino M, Katoh S, Sasaki T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: **8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is a prognostic mediator for cardiac event.** *Eur J Clin Invest* 2011,**41**:759–766.
- [25] Kobayashi S, Susa T, Tanaka T, Wada Y, Okuda S, Doi M, Nao T, Yoshiga Y, Yamada J, Okamura T, Ueyama T, Kawamura S, Yano M, Matsuzaki M: **Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine reflects symptomatic status and severity of systolic dysfunction in patients with chronic heart failure.** *Eur J Heart Fail* 2011,**13**:29-36.

- [26] Nagayoshi Y, Kawano H, Hokamaki J, Miyamoto S, Kojima S, Shimomura H, Tsujita K, Sakamoto T, Yoshimura M, Ogawa H: **Urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine levels increase after reperfusion in acute myocardial infarction and may predict subsequent cardiac events.** *Am J Cardiol* 2005,**95**:514-517.
- [27] Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A: **Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction.** *Circ Res* 2001,**88**:529-535.
- [28] Richelle M, Turini ME, Guidoux R, Tavazzi I, Métairon S, Fay LB. **Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet.** *FEBS Letters* 1999,**459**:259-262.
- [29] Schulz R, Smith JA, Lewis MJ, Moncada S: **Nitric oxide synthase in cultured endocardial cells of the pig.** *Br J Pharmacol* 1991,**104**:21-24.
- [30] Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: **Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.** *Proc Nat Acad Sci USA* 1990,**87**:1620-1624.
- [31] Stühlinger MC, Conci E, Haubner BJ, Stocker EM, Schwaighofer J, Cooke JP, Tsao PS, Pachinger O, Metzler B: **Asymmetric Dimethyl L-Arginine (ADMA) is a critical regulator of myocardial reperfusion injury.** *Cardiovasc Res* 2007,**75**:417-425.
- [32] Ghebremariam YT, LePendu P, Lee JC, Erlanson DA, Slaviero A, Shah NH, Leiper J, Cooke JP: **Unexpected effect of proton pump inhibitors: elevation of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine.** *Circulation* 2013,**128**:845-453.

- [33] Karu I, Zilmer K, Starkopf J, Zilmer M: **Changes of plasma asymmetric dimethylarginine levels after coronary artery bypass grafting.** *Scand Cardiovasc J* 2006,**40**:363-367.
- [34] Sari AN, Kacan M, Unsal D, Sahan Firat S, Kemal Buharalioglu C, Vezir O, Korkmaz B, Cuez T, Canacankatan N, Sucu N, Ayaz L, Tamer Gumus L, Gorur A, Tunctan B: **Contribution of RhoA/Rho-kinase/MEK1/ERK1/2/iNOS pathway to ischemia/reperfusion-induced oxidative/nitrosative stress and inflammation leading to distant and target organ injury in rats.** *Eur J Pharmacol* 2014,**723**:234-245.
- [35] Wells SM, Holian A: **Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007,**36**:520-528.
- [36] Yuan Q, Jiang DJ, Chen QQ, Wang S, Xin HY, Deng HW, Li YJ: **Role of asymmetric dimethylarginine in homocysteine-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007,**356**:880-885.

5. CAPÍTULO II

Artigo em fase final de redação. A doutoranda participou diretamente de todas as fases do trabalho de pesquisa, desde a coleta das amostras até a redação do artigo.

Therapeutic hypothermia reduces oxidative damage and alters antioxidant defenses post-cardiac arrest

Fernanda S. Hackenhaar^{1,2}, Tássia M. Medeiros^{1,2}, Camile S. Behling^{1,2}, Jordana S. Putti^{1,2},
Camila D. Mahl^{1,2}, Cleber Verona^{1,2,3}, Ana Carolina A. da Silva^{1,2}, Larissa M. de Souza^{1,2},
Maria C. Guerra⁴, Carlos A. S. Gonçalves⁴; Vanessa Oliveira³; Diego F. M. Riveiro³;
Silvia R. R. Vieira⁵, Mara S. Benfato^{1,2,*}

¹Departamento de Biofísica, UFRGS, Porto Alegre, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS, Porto Alegre, Brazil; ³Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brazil; ⁴Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, Brazil; ⁵Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

*Address correspondence to this author at the Departamento de Biofísica (IB), Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43422, sala 204, Porto Alegre, RS, Brazil; CEP 91501-970. Tel: +55-51 3308 7603; Fax: +55-51 3308 7003; E-mail: mara.benfato@ufrgs.br.

Abstract

During post-cardiac arrest syndrome, damage to organs consequent of ischemia-reperfusion has been attributed to oxidative stress, as sudden return of oxygen to circulation increases the generation of reactive species. Mild therapeutic hypothermia has been the only clinically applied treatment to reduce injury consequent of cardiac arrest and may reduce oxidative damage. Our study aimed to compare parameters of oxidative damage and antioxidant defenses in controlled normothermic patients and patients underwent mild therapeutic hypothermia during post-cardiac arrest syndrome. We investigated intensive care unit patients admitted in 2011 and 2012, victims of in-hospital or out-of-hospital cardiac arrest in Porto Alegre, Brazil, and included 31 patients under controlled normothermia (36 °C) and 11 patients who underwent 24 h mild therapeutic hypothermia (33 °C). Oxidative stress parameters were assessed 6, 12, 36 and 72 h after cardiac arrest in central venous blood samples. Hypothermic and controlled normothermic patients presented similar long-term survival rate and S100B levels. Our results show hypothermia reduces malondialdehyde and protein carbonyl levels, markers of oxidative damage. Concomitantly, hypothermia increases the activity of erythrocyte antioxidant enzymes superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase, while decreases the activity of serum paraoxonase-1 antioxidant activity. Moreover, hypothermia and acidosis may alter xanthine oxidase activity post-cardiac arrest. Our results suggest mild therapeutic hypothermia reduces oxidative damage and alters antioxidant defenses in post- cardiac arrest patients.

Key words

Cardiopulmonary arrest, post cardiac arrest syndrome, mild therapeutic hypothermia, ischemia-reperfusion, oxidative stress, S100B, xanthine oxidase, paraoxonase, malondialdehyde, carbonyl.

1. Introduction

Post-cardiac arrest syndrome (PCRS) nominates the pathophysiological consequences of the return of spontaneous circulation (ROSC) after successful cardiopulmonary resuscitation (CPR) from cardiac arrest (CA). PCRS comprehends brain injury, hemodynamic dysfunction, damage to heart and other organs, sepsis and systemic inflammation consequent of ischemia-reperfusion (I/R). The first 3 days after CA are considered critical phase of PCRS, when patients suffer progressive organ damage and increase of inflammation [1].

During PCRS, injury to brain, heart and to other organs consequent of I/R has been attributed to oxidative stress, as sudden return of oxygen to circulation increases the generation of reactive species (RS) [2, 3]. Generation of RS, mainly the superoxide radical, increases dramatically after reperfusion and depends on xanthine oxidoreductases (XOR) and other pathways [4, 5]. The endothelial XOR plays a well-known role in free radical generation during hypoxia and reperfusion, when xanthine dehydrogenase (XDH) is converted to xanthine oxidase (XO), using O_2 as electron acceptor in place of NAD^+ , generating superoxide and hydrogen peroxide [6].

Post-CA hypoxia leads not only to oxidative stress, being followed by marked metabolic acidosis. Anaerobic glycolysis decreases glucose levels while increasing lactate formation. Concomitantly, a compensatory mechanism to restore pH increases levels of calcium and sodium, and other electrolytes as potassium and magnesium [7]. Higher blood lactate levels are found in patients with poor outcome post-CA, since they are related to the time patients underwent hypoxia and acidosis [8].

Mild therapeutic hypothermia (MTH) has now been the only clinically applied treatment to reduce injury post-CA, and clinical and animal model studies have been reinforcing the benefits of MTH in increasing brain recovery [9-11]. MTH also prevent damage to other

tissues, including myocardium, liver and kidney [12]. The prevention of damage by MTH is reinforced by studies demonstrating reduced oxidative damage after treatment [11-13]. Hypothermia can also be involved in the prevention of acidosis and lactate clearance, restoring normal metabolism [14, 15].

Our study aims to investigate oxidative stress during PCRS, 6, 12, 36 and 72h post-CA in intensive care unit patients, comparing normothermic patients and patients who underwent MTH. Our results show MTH reduces malondialdehyde and protein carbonyl levels. Concomitantly, MTH increases the activity of erythrocyte antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST), while decreases the activity of serum paraoxonase (PON-1) antioxidant activity. Moreover, our results suggest hypothermia and acidosis may alter XO activity post-CA.

2. Materials and Methods

2.1 Screening of patients

Observational prospective cohort study was conducted between May 2011 and October 2012 assigned in intensive care unit (ICU) patients of a public hospital in Porto Alegre, Brazil. Project was approved by institutional ethics committee and relatives of all subjects provided written informed consent. The study screened comatose patients, victims of in-hospital or out-of-hospital CA, presenting successful ROSC in less than 20 min after cardiopulmonary resuscitation (CPR). Patients were randomly assigned for actively controlled normothermic temperature (36 °C, n= 31) or therapeutic hypothermia (33 °C, n= 11). Exclusion criteria were: patients <18 years old, trauma victims, post operative patients (<7 days post operation), patients who suffered more than one CA event during admission, pregnant, terminal or hemodynamically unstable patients. Full medical history was evaluated for each patient.

2.2 Mild therapeutic hypothermia (MTH)

MTH post-CA was employed in agreement with local protocol. Cooling started 4 h after CA aiming 32-34 °C. Cooling method applied combined methods, including endovascular cooling, ice packs, air conditioning and thermal blanket for controlled cooling and rewarm of patients (Mattress Medi-Therm® III Hyper/Hypothermia Machine MTA 6900-Gaymar). Temperature was measured continuously. Neuromuscular-blocking drug (atracurium and/or pavulon) was administered to control chills, thereby preventing body heat. Rewarm to the target temperature of 36 °C started after 24 h of hypothermia and not exceeded 0.25-0.5 °C/h. Hyperthermia was promptly treated in both normothermic and hypothermic patients, since temperature above 37 °C is related to poor outcome [16]. Hyperoxia was avoided as well, avoiding exacerbated oxidation processes in early stages of reperfusion.

2.3 Clinical and laboratory data assessment, and sample obtaining

Clinical and laboratory data, and venous blood samples were obtained from patients 6, 12, 36 and 72 h after CA for both normothermic and hypothermic patients. Clinical data analysis included blood pressure, internal body temperature, heart rate and respiratory rate. Laboratory data were assessed in venous blood by hospital biochemical staff and included pH, glucose, lactate and electrolytes. High-sensitive C-reactive protein (hs-CRP), hematocrit and hemoglobin levels were daily analyzed by hospital biochemical staff.

Venous blood samples were obtained from central venous catheter to analyze oxidative stress and neuronal injury biomarkers. 10 mL of total blood was prepared for serum, plasma (citrate) and erythrocytes samples obtaining. Samples were stored within 30 min after the blood obtaining in liquid nitrogen and posteriorly stored at -80°C. Erythrocytes were lysated and 1:100 diluted in 2% ethanol and 0.5 mmol/L protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride.

2.4 Neuronal injury and oxidative stress biomarkers

Serum S100 calcium-binding protein B (S100B) levels. S100B levels were determined using in-house ELISA method. Serum samples were coated with anti-S100B monoclonal antibody (SH-B1, Sigma-Aldrich) and posteriorly incubated with anti-S100 polyclonal (DAKO), followed by incubation with peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Sigma-Aldrich). Reaction with o-phenylenediamine was measured by spectrophotometer at 492 nm [17].

Plasma carbonyl levels. Plasma was incubated with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to evaluate carbonyl content by spectrophotometer at 370nm. Molar absorption coefficient of hydrazine ϵ_{370}^M 21,000 M⁻¹cm⁻¹ was used to calculate carbonyl levels [18].

Serum malondialdehyde (MDA) levels. Serum MDA levels were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) at 250 nm (LC-18 DB column) [19].

Xanthine oxidase (XO) activity. Serum activity of XO was measured using xanthine oxidase fluorometric assay kit (Cayman chemical), applying excitation wavelength of 520-550 nm and an emission wavelength of 585-595 nm.

Superoxide dismutase (SOD) activity. SOD activity was measured in erythrocytes lysate samples by spectrophotometry using RanSOD kit (Randox).

Glutathione peroxidase (GPx) activity. GPx activity was measured in erythrocytes lysate samples by spectrometry in using RanSel kit (Randox).

Glutathione-S-transferase (GST) activity. GST activity was measured by spectrophotometry measuring the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and GSH forming S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathione. Erythrocytes lysate activity was calculated using the molar absorption coefficient of S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathione ϵ_{340}^M 9,600 M⁻¹cm⁻¹ [20].

Paraoxonase (PON-1) activity. Serum PON-1 activity was measured by spectrophotometry 412 nm using paraoxon, based on the p-nitrophenol formation by paraoxon hydrolysis. P-nitrophenol molar extinction coefficient ϵ_{412}^M 169,000 M⁻¹cm⁻¹ was used to calculate PON-1 activity [21, 22].

Data normalization. All assays were performed in triplicate. All results were normalized using the total protein content by Bradford method, using bovine serum albumin (BSA) as standard [23].

2.5 Statistical analysis

PASW statistics 18 (SPSS) software was used for multivariable logistic-regression models with generalized estimating equations to compare evaluated parameters. Long-term survival rates (36 months) were evaluated by Kaplan-Meier analysis. Two-tailed Spearman's correlation test was employed to test correlation between variables. Sample

size for 42 patients was calculated employing the COMPARE2 software, based on MDA values from previous study to obtain a power of 80 %, and a significance level of 5 % [24].

3. Results

Baseline characteristics and biomarkers of outcome

A total of 42 patients were included in the study. Thirty one patients were assigned for actively controlled normothermic temperature (36 °C) and were not subjected to hypothermia, while eleven patients underwent hypothermic treatment (33 °C). In hypothermic patients, body temperature achieved 33 °C 6 h after CA and was maintained during 24 h, as shown 6 and 12 h after CA (Table 2). 36 h after CA, patients achieved 36 °C of body temperature (Table 2).

Baseline characteristics of patients are presented in Table 1. Age and gender of patients did not differ significantly comparing normothermic and hypothermic groups. ROSC also did not differ between groups, evidencing similarity of baseline characteristics in the analyzed patients. Importantly, hypothermic patients did not present increased long-term survival rate, compared to patients with actively controlled normothermia (Table 1).

Table 1: baseline characteristics of 42 in- and out-of-hospital cardiac arrest patients

	Normothermic (n= 31)	Hypothermic (n= 11)	All patients (n= 42)	<i>p</i> value
Age, years (min; max)	63 (32 ; 89)	60 (46 ; 76)	62 (32 ; 89)	ns
Male gender, n (%)	20 (64.5)	7 (63.6)	27 (64.3)	ns
Time to ROSC, min (min; max)	8 (2 ; 20)	6 (4 ; 16)	8 (2 ; 20)	ns
Survival, days (min; max)	8 (1 ; 693)*	18 (1 ; 163)	8 (1 ; 693)	ns

ROSC, return of spontaneous circulation.

Data are expressed as median (min; max), except for gender expressed as absolute numbers (%)

ns, no significant difference found.

*Two patients of normothermic group were alive three years after CA

Blood hs-CRP levels, a biomarker of inflammation, was not significantly altered by hypothermic treatment (Table 2). Other important biomarkers of outcome after CA were evaluated, including blood levels of calcium, sodium, glucose and lactate. pH, lactate, calcium and sodium levels were not altered in hypothermic patients (Table 2). Blood levels of lactate decreased significantly 12 h after CA in both groups, and were maintained at the

same levels 36 and 72 h (Table 2). The decreased blood glucose levels found at the initial 6 and 12 h after CA were significantly increased in patients treated with hypothermia (Table 2), returning to similar levels 36 and 72 h after CA in both groups (Table 2).

Table 2: Biomarkers of outcome in patients ongoing PCRS

	Normothermic patients				Hypothermic patients			
	6h	12h	36h	72h	6h	12h	36h	72h
Temperature, °C	35.7 (34.7;37.3)	35.7 (35.0;37.2)	35.6 (34.3;37.5)	36.1 (35.0;36.9)	32.8 (31.3;34.0)+,#	32.6 (30.4;33.5)+,#	36 (34.2;36.8)	36.1 (35.7;37.0)
hs-CRP, mg/L	89 (17;361)	n.a.	120 (22;480)	113 (2;338)	155 (95;403)	n.a.	170 (27;313)	240 (26;351)
S100B, ng/mL	0.13 # (0.01;6.63)	0.07 (0.01;1.42)	0.06 (0.001; 1.8)	0.5 (0.01;1.3)	0.15 # (0.02;1.8)	0.9 (0.04;0.71)	0.04 (0.01;0.6)	0.03 (0.02;1.10)
Venous pH	7.29 (7.02;7.51)	7.36 (7.15;7.54)	7.32 (7.03;7.45)	7.32 (7.31;7.41)	7.16 (6.95;7.50)	7.26 (7.07;7.56)	7.41 (7.21;7.52)	7.38 (6.89;7.44)
Glucose, mg/dL	115 + (73;294)	118 + (81;255)	139 (73;201)	155 (62;297)	167 +,# (87;398)	135 # (115;351)	130 (98;169)	105 (76;141)
Lactate, mmol/L	2.95 + (0.8;13.7)	1.8 (0.7;17)	1.4 (0.7;11.8)	1.7 (0.5;8.5)	1.95 + (0.6;18)	1.8 (0.6;19)	1.6 (1.0;4.2)	1.4 (0.6;1.5)
Sodium, mmol/L	136 (124; 147)	137 (122; 145)	138 (129; 144)	133 (128; 143)	137 (119; 153)	103 (94;113)	137 (123; 147)	138.5 (137; 147)
Calcium, mg/dL	1.06 (0.88;1.19)	1.01 (0.86;1.19)	1.05 (0.82;1.22)	1.08 (0.88;1.23)	1.03 (0.95;1.2)	1.03 (0.94;1.13)	1.03 (0.86;1.15)	1.11 (1.03;1.28)

Hs-PCR, high-sensitive C reactive protein.

Data are expressed as median (min; max).

+ Significantly different inside the group comparing time -points, $p < 0.05$.

Significantly different comparing normothermic and hypothermic groups at the same time -point, $p < 0.05$.

Oxidative and brain damage biomarkers

Serum levels of S100B, a biomarker of brain injury, did not differ significantly in hypothermic patients. S100B levels decreased significantly 12 h after CA in both groups, and remained similar after 36 and 72 h (Fig 1).

MTH clearly reduced the parameters of oxidative damage evaluated in our study. Plasma carbonyl levels, a biomarker of protein oxidative damage, decreased significantly in patients treated with hypothermia in all time-points after CA (Fig.1). In a similar manner, hypothermic patients presented decreased serum malondialdehyde levels, a biomarker of lipid oxidative damage, in all time-points after CA as well (Fig.1). XO activity did not differ significantly in hypothermic patients comparing to normothermic patients. However, in hypothermic group, xanthine oxidase activity decreased 36 and 72 h after CA, coinciding with the period post- hypothermic treatment (Fig.1).

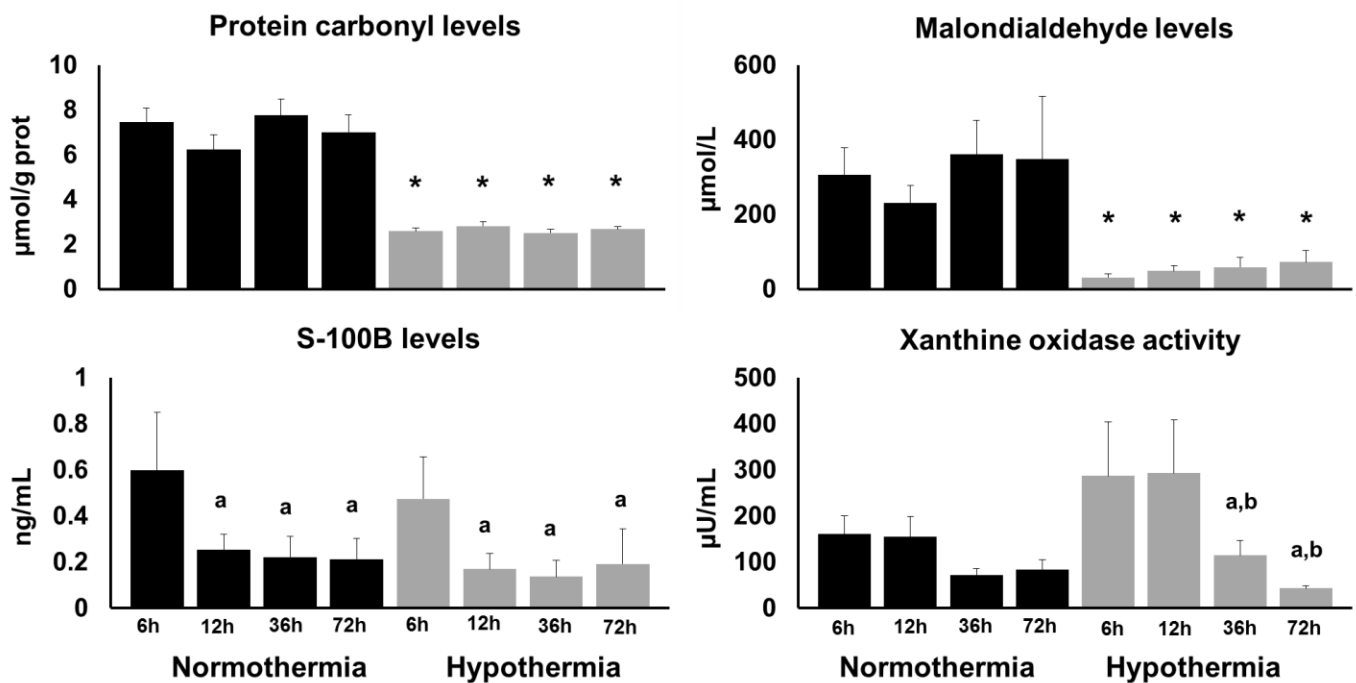


Figure 1. Biomarkers of oxidative damage and brain injury 6, 12, 36 and 72 h post-CA comparing normothermic (n=31) and hypothermic (n=11) patients. At 6 and 12 h, patients of hypothermia group presented 33 °C of body temperature and 36 °C at 36 and 72 h post-CA. Data are expressed as mean ± standard error. *Significantly different comparing normothermic and hypothermic groups at the same time-point, p<0.05. ^aSignificantly different inside the group comparing to 6h, p<0.05. ^bSignificantly different inside the group comparing to 12 h, p<0.05.

Correlation analysis: Due to its relevance in I/R, XO activity was correlated to the analyzed biomarkers of outcome and acidosis. XO activity was negatively correlated to venous pH ($R= -0.360$, $p<0.01$) and positively correlated to blood lactate ($R= 0.405$, $p<0.001$). Conversely, xanthine oxidase activity was inversely correlated to blood calcium levels ($R= -0.543$, $p<0.001$) and blood sodium levels ($R= -0.332$, $p<0.01$). Importantly, serum S100B levels were positively correlated to xanthine oxidase activity ($R= 0.412$, $p<0.001$) however no correlation was found between XO activity and MDA ($R= 0.194$, $p=0.271$) or between MDA and carbonyl levels ($R= 0.010$, $p=0.907$).

Enzymatic antioxidant activities

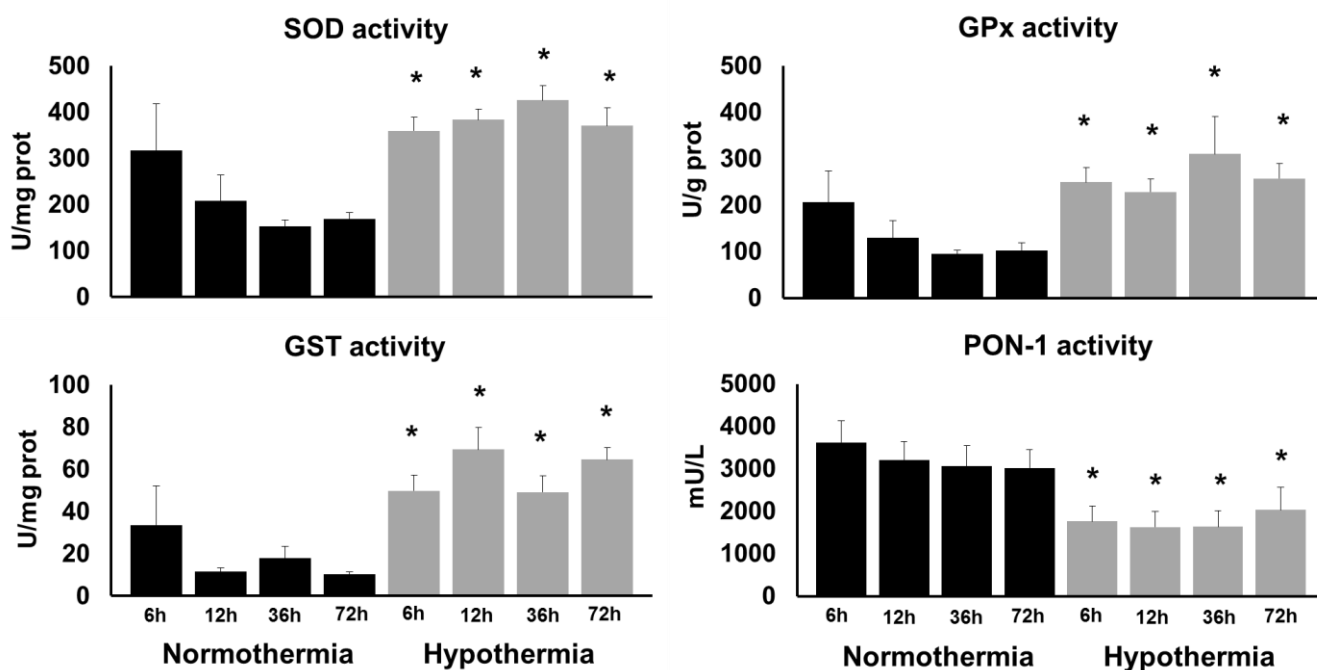


Figure 2. Antioxidant enzymatic activity 6, 12, 36 and 72 h post-CA comparing normothermic (n=31) and hypothermic (n=11) patients. At 6 and 12 h, patients of hypothermia group presented 33°C of body temperature and 36 °C at 36 and 72 h post-CA. Data are expressed as mean \pm standard error. *Significantly different comparing normothermic and hypothermic groups at the same time-point, $p<0.05$.

The activities of antioxidant enzymes related to the detoxification of RS were significantly altered by hypothermic treatment. Activities of erythrocyte antioxidant enzymes SOD, GPx and GST increased significantly 6, 12, 36 and 72 h after CA in hypothermic patients, comparing to normothermic patients (Fig. 2). Surprisingly, PON-1 activity, an antioxidant enzyme present in high-density lipoproteins (HDL), presented an inversed profile comparing to the other antioxidant enzymes analyzed. Serum PON-1 activity is significantly decreased in hypothermic patients 6, 12, 36 and 72 h after CA (Fig. 2).

Correlation analysis: Conversely, activities of erythrocyte antioxidant enzymes are strongly correlated. SOD activity is positively correlated with GPx ($R= 0.845$, $p<0.001$) and GST ($R= 0.745$, $p<0.001$) activities. GPx is also strongly correlated to GST activity ($R= 0.629$, $p<0.001$). Interestingly, Serum PON-1 activity is not correlated to the activity of analyzed erythrocyte antioxidant enzymes (SOD, $R= -0.156$, $p=0.082$; GPx, $R= -0.097$, $p=0.288$; GST, $R= -0.154$, $p=0.085$).

4. Discussion

Survival and neuronal injury

Controversy has emerged upon the efficacy of MTH post-CA. After MTH was recommended by international resuscitation guidelines [25, 26], many studies are pointing out that the reduction of mortality and neuronal damage by MTH is based on the control of body temperature, not hypothermia *per se*. Comparing treatment at target temperatures of 33 °C (473 patients) and 36 °C (466 patients), no difference in survival and neurological outcome was observed [27]. Similar results were obtained for survival and functional outcome in children post-CA comparing therapeutic hypothermia with therapeutic normothermia [28]. It has been suggested that only the control of body temperature below 37 °C is enough to bring benefits for survival and patient outcome.

However, other studies are still pointing out benefits of MTH comparing to controlled normothermic temperature. In a porcine model of CA, comparing controlled temperatures of 33 and 36.8 °C, 33 °C group presented improved cerebral oxygen saturation and arterial pressure, followed by decrease in damage biomarkers in heart, liver and kidney. Interestingly, the marker of neuronal damage evaluated, neuron-specific enolase, was not altered by hypothermia [12]. Despite S100B is considered better marker of poor neurological outcome compared to neuron-specific enolase [29], in our study S100B levels were not altered by MTH as well (Fig.1). Control and maintenance of body temperature below 37° in normothermic group may explain the similarity in survival (Table 1) and S100B levels (Fig. 1) comparing to hypothermic patients.

Oxidative damage and xanthine oxidase activity

Oxidative stress has been implicated as crucial in organ damage and hemodynamic dysfunction during PCRS. MTH may be a suitable treatment to decrease oxidative stress. In accordance, MTH decreases frontal cortex MDA and carbonyl levels 24 h after ROSC

in pig model of CA [11]. In one of the few studies assessing oxidative stress in patients post-CA treated with hypothermia, plasma reactive oxygen metabolites (d-ROM) decreased during 33 °C treatment [13]. Interestingly, after rewarming, d-ROM returned to control group levels, differently from our results in which MDA and carbonyl levels remained lower in hypothermic group even after rewarming (Fig. 1). In a porcine model of CA, MTH also decreased serum reactive oxygen metabolites levels compared to controlled normothermic animals [12]. In I/R rat models, MDA levels are increased in liver [30, 31], lung, ileum [31] and skeletal muscle, were MDA levels were restored by MTH [32]. To our knowledge, no works reported protein carbonyl as marker of oxidative damage post-CA. Nevertheless, carbonyl levels presented similar profile to MDA levels, since MTH reduced significantly the levels of both markers during PCRS (Fig. 1). These results corroborate the hypothesis of decrease of oxidative damage by MTH.

Besides the well-characterized increase of XO activity generating RS during I/R [33], recent studies are still characterizing the mechanisms of XO regulation, including increase of XOR expression [2] and redox modifications due to I/R [6, 34]. Our study is pioneer in evaluating XO activity in patients post-CA and MTH (Fig.1). Nevertheless, no significantly difference was found during MTH at 6 and 12 h post-CA. However after rewarming, 36 and 72 h post-CA, XO activity decreased in hypothermic group (Fig. 1). It is important to point out that the decreased XO activity at 36 and 72h in hypothermic group is not significantly different from normothermic group at the same time-points (Fig. 1). Further studies will be necessary to elucidate the effect of temperature on XOR regulation. High lactate levels and impaired lactate clearance are frequently related to poor outcome post-CA [16, 35]. Decrease in lactate levels after 12h found in our study is expected, due to the clearance of lactate in circulation (Table 2). Despite the reduced blood glucose levels found 6 and 12 h post-CA in normothermic group were increased by MTH (Table 2),

parsimony is necessary to evaluate glucose data in post-CA patients, since glycaemia is actively controlled by ICU.

Hypoxic acidosis have relevant role in XOR regulation [36] however the exact mechanism is yet to be described. It is possible that ion imbalance participates in the upregulation of XO in I/R together with the changes in oxygen saturation. During post-CA acidosis blood calcium, sodium and other electrolytes increase as a compensatory mechanism to high lactate [7]. Interestingly, our results show that XO activity is positively correlated to lactate and inversely correlated to pH, calcium and sodium, suggesting XO regulation may be related to acidosis in our patients. Nevertheless, XO activity is not correlated to oxidative damage biomarkers in our study, however was positively correlate to S100B (see results for correlation analysis). Despite we initially hypothesized XO correlation to MDA and carbonyl levels, it is possible that the different profile found in XO activity compared to the marked low carbonyl and MDA levels in hypothermic group may explain the lack of correlation (Fig. 1).

Antioxidant activity

Activity of antioxidant enzymes are also altered as consequence of I/R post-CA and hypothermia may restore impaired defenses. Despite the few works evaluating antioxidant defenses post-CA in patients, I/R models may provide information on the subject. In rat models of I/R damage, SOD activity decreased in liver, lungs and ileum [30-32]. A similar study in liver found the same profile for SOD and hydrogen peroxide consumption, however GPx activity increased after I/R [30]. Similar to our results (Fig. 2), I/R in rat skeletal muscle decreased activity of SOD and GPx, and tissue activities were restored by MTH [32]. MTH also increased MnSOD expression in frontal cortex of pigs post-CA [11]. No previous study was found evaluating the detoxification enzyme GST post - CA or I/R. In our study, erythrocyte antioxidant enzymes SOD, GPx and GST presented similar

profiles, with markedly increased activities after MTH during PCRS comparing to normothermic group (Fig. 2), and correlated positively to each other (see results for correlation analyses).

MTH decreased plasma biological antioxidant potential during treatment in patients post-CA, returning to control levels after rewarming [13]. Biological antioxidant potential (BAP) is a broad assay which detects enzymatic and non-enzymatic antioxidants together indistinctly BAP was also evaluated in serum of MTH post-CA in pig model, however not significant difference was found [12]. Both studies do not corroborate our results; however we applied specific methods for each antioxidant enzyme (Fig. 2).

To our knowledge, our study is the first one to evaluate PON-1 activity in post-CA patients and we observed significant decrease of PON-1 activity after MTH (Fig.2). PON-1 activity is reduced after I/R in serum, liver, kidney and lung of rats [37]. In patients undergoing coronary intervention with no-reflow, an I/R event, blood PON-1 activity was lower after the ischemia compared with patients with normal flow [38]. Interestingly, serum PON-1 activity presented an inverse profile when compared to the analyzed erythrocyte antioxidant enzymes SOD, GPx and GST (Fig.2). Moreover, there was no correlation between serum PON-1 activity and erythrocyte enzymes (see results for correlation analyses). We suggest erythrocyte SOD, GPx and GST are regulated differently from serum PON-1 during I/R and MTH treatment.

Limitations

The main limitation of the present work is the lack of control patients who did not undergo CA, making difficult to discuss the influence of CA alone in oxidative stress parameters. Experimental models of CA permit a clearer vision of SPCR. A second limitation is the lack of biochemical and clinical data before CA due to the high number of out-of-hospital CA patients. Another limitation is related to difference in medication, since

hypothermic patients received specific medication during MTH. Due to the high complexity and time necessary for sample obtaining the low number of patients, mainly in hypothermia group, is an important limitation. Another limitation is the lack of sample obtaining time-point closer to the CA moment; however we stipulated 6h as the first sampling time-point to avoid disturbing unstable patients and, more importantly, in order to avoid interruption of patients care.

Conclusion

In our study, MTH reduced MDA and protein carbonyl levels comparing to controlled normothermic patients. We also observed increase in activity of erythrocyte antioxidant enzymes SOD, GPx and GST, and concomitant decrease in serum PON-1 antioxidant activity by MTH. Nevertheless, hypothermic and controlled normothermic patients presented similar long-term survival rate and S100B levels.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Amparo e Pesquisa do Rio Grande do Sul (Fapergs) and Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular of Universidade Federal do Rio Grande do Sul-PPGBCM-UFRGS. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper. Contribution of authors: FSH performed the research; FSH analyzed the data and wrote the paper; FSH, TMM, CSB, JSP, CDM, CV and ACAS contributed to samples obtaining and experimental work; MLS, MCS and CASG contributed to experimental work and essential reagents and equipment; VO, DFMR, SRRV and MSB designed and supervised the research study.

Conflict of interest statement

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

List of abbreviations

CA, cardiac arrest.

CPR, cardiopulmonary resuscitation.

GPx, glutathione peroxidase.

GST, glutathione-S-transferase.

hs-CRP, high-sensitive C-reactive protein.

I/R, ischemia-reperfusion.

MDA, malondialdehyde.

PCRS, post-cardiac arrest syndrome.

PON-1, paraoxonase-1.

ROSC, return of spontaneous circulation.

RS, reactive species.

S100B, S100 calcium-binding protein B.

SOD, superoxide dismutase.

XO, xanthine oxidase.

XOR, xanthine oxidoreductase.

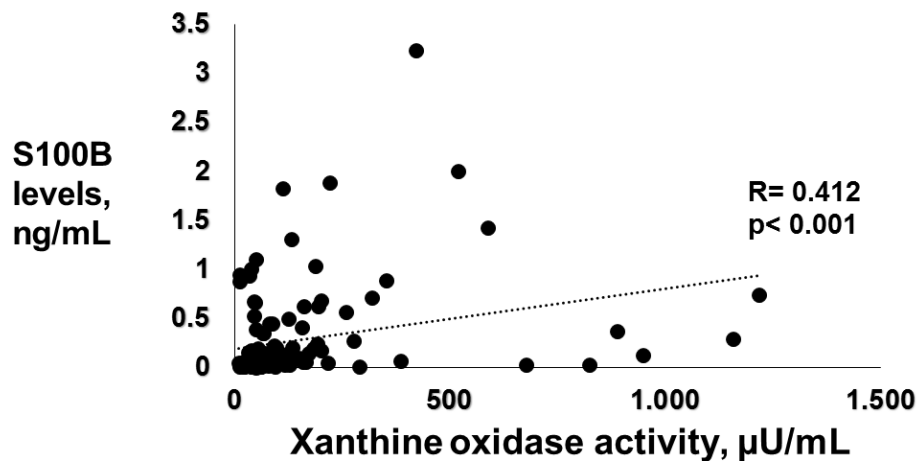
References

- [1] Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, *et al.* Post-cardiac arrest syndrome: Epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication a scientific statement from the international liaison committee on resuscitation; the american heart association emergency cardiovascular care committee; the council on cardiovascular surgery and anesthesia; the council on cardiopulmonary, perioperative, and critical care; the council on clinical cardiology; the council on stroke. *Resuscitation*. 2008; 79: 350-79.
- [2] Zhang Y-S, Liu B, Luo X-J, *et al.* A novel function of nuclear nonmuscle myosin regulatory light chain in promotion of xanthine oxidase transcription after myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 2015; 83: 115-28.
- [3] Hackenhaar FS, Fumagalli F, Li Volti G, *et al.* Relationship between post-cardiac arrest myocardial oxidative stress and myocardial dysfunction in the rat. *J Biomed Sci*. 2014; 21:70.
- [4] Gielis JF, Boulet GA, Briede JJ, *et al.* Longitudinal quantification of radical bursts during pulmonary ischaemia and reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015; 48: 622-8.
- [5] Angelos MG, Kutala VK, Torres CA, *et al.* Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290: 341-7.
- [6] Battelli MG, Bolognesi A, Polito L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842: 1502-17.
- [7] Makino J, Uchino S, Morimatsu H, Bellomo R. A quantitative analysis of the acidosis of cardiac arrest: A prospective observational study. *Crit Care*. 2005; 9: 357-62.
- [8] Orban J-C, Scarlatti A, Danin P-E, *et al.* Assessment of muscle tissue oxygen saturation after out-of-hospital cardiac arrest. *J Crit Care*. 2015; 30: 1184-9.
- [9] Li Y, Ristagno G, Guan J, *et al.* Preserved heart rate variability during therapeutic hypothermia correlated to 96 hrs neurological outcomes and survival in a pig model of cardiac arrest. *Crit Care Med*. 2012; 40: 580-6.
- [10] Testori C, Sterz F, Behringer W, *et al.* Mild therapeutic hypothermia is associated with favourable outcome in patients after cardiac arrest with non-shockable rhythms. *Resuscitation*. 2011; 82: 1162-7.
- [11] Gong P, Li C-S, Hua R, *et al.* Mild hypothermia attenuates mitochondrial oxidative stress by protecting respiratory enzymes and upregulating mnsod in a pig model of cardiac arrest. *Plos One*. 2012; 7: e35313. doi: 10.1371/journal.pone.0035313.
- [12] Ostadal P, Mlcek M, Kruger A, *et al.* Mild therapeutic hypothermia is superior to controlled normothermia for the maintenance of blood pressure and cerebral oxygenation, prevention of organ damage and suppression of oxidative stress after cardiac arrest in a porcine model. *J Transl Med*. 2013; 11: 124.

- [13] **Dohi K, Miyamoto K, Fukuda K, et al.** Status of systemic oxidative stress during therapeutic hypothermia in patients with post-cardiac arrest syndrome. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013:562429.
- [14] **Starodub R, Abella BS, Grossestreuer AV, et al.** Association of serum lactate and survival outcomes in patients undergoing therapeutic hypothermia after cardiac arrest. *Resuscitation.* 2013; 84: 1078-82.
- [15] **Leon K, Pichavant-Rafini K, Ollivier H, L'Her E.** Effect of induced mild hypothermia on acid-base balance during experimental acute sepsis in rats. *Ther Hypothermia Temp Manag.* 2015; 5: 163-70.
- [16] **Zeiner A, Holzer M, Sterz F, et al.** Hyperthermia after cardiac arrest is associated with an unfavorable neurologic outcome. *Arch Intern Med.* 2001; 161: 2007-12.
- [17] **Leite MC, Galland F, Brolese G, et al.** A simple, sensitive and widely applicable elisa for s100b: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods.* 2008; 169: 93-9.
- [18] **Levine RL.** Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32: 790-6.
- [19] **Karatepe M.** Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *Lc Gc North Am.* 2004; 7: 36-8.
- [20] **Tsuchida S.** Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. 1st ed. Oxford University Press: London; 2000; 83-5.
- [21] **van Himbergen TM, Roest M, de Graaf J, et al.** Indications that paraoxonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 2005; 46: 445-51.
- [22] **Eckerson HW, Wyte CM, Ladu BN.** The human-serum paraoxonase arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1983; 35: 1126-38.
- [23] **Bradford MM.** Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
- [24] **Turedi S, Gunduz A, Mentese A, et al.** Investigation of the possibility of using ischemia-modified albumin as a novel and early prognostic marker in cardiac arrest patients after cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation,* 2009; 80: 994-9.
- [25] **Holzer M, Cerchiari E, Martens P, et al.** Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *New Engl J Med.* 2002; 346: 549-56.
- [26] **Bernard SA, Gray TW, Buist MD, et al.** Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *New Engl J Med.* 2002; 346: 557-63.
- [27] **Nielsen N, Wettersley J, Cronberg T, et al.** Targeted temperature management at 33 degrees c versus 36 degrees c after cardiac arrest. *New Engl J Med.* 2013; 369: 2197-206.

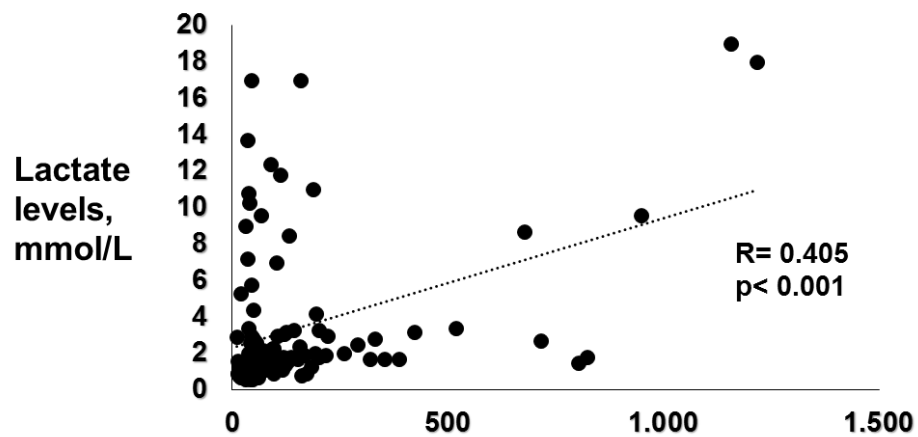
- [28] **Moler FW, Silverstein FS, Holubkov R, et al.** Therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest in children. *New Engl J Med.* 2015; 372: 1898-908.
- [29] **Shinozaki K, Oda S, Sadahiro T, et al.** Serum s-100b is superior to neuron-specific enolase as an early prognostic biomarker for neurological outcome following cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation.* 2009; 80: 870-5.
- [30] **Abdel-Gaber SA, Ibrahim MA, Amin EF, et al.** Effect of selective versus non-selective cyclooxygenase inhibitors on ischemia-reperfusion-induced hepatic injury in rats. *Life Sci.* 2015; 134: 42-8.
- [31] **Tekin IO, Sipahi EY, Comert M, et al.** Low-density lipoproteins oxidized after intestinal ischemia/reperfusion in rats. *J Surg Res.* 2009; 157: 47-54.
- [32] **Ozkan H, Ekinçi S, Uysal B, et al.** Evaluation and comparison of the effect of hypothermia and ozone on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle in rats. *J Surg Res.* 2015; 196: 313-9.
- [33] **Zweier JL, Kuppusamy P, Lutty GA.** Measurement of endothelial-cell free-radical generation - evidence for a central mechanism of free-radical injury in postischemic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85: 4046-50.
- [34] **Zhang Y, Hu S, Chen Y.** Hepatocyte growth factor suppresses hypoxia/reoxygenation-induced XO activation in cardiac microvascular endothelial cells. *Heart Vessels.* 2015; 30: 534-44.
- [35] **Donnino MW, Miller J, Goyal N, et al.** Effective lactate clearance is associated with improved outcome in post-cardiac arrest patients. *Resuscitation.* 2007; 75: 229-34.
- [36] **Khambata RS, Ghosh SM, Ahluwalia A.** "Repurposing" of xanthine oxidoreductase as a nitrite reductase: A new paradigm for therapeutic targeting in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2015; 23: 340-53.
- [37] **Tufek A, Tokgoz O, Aliosmanoglu I, et al.** The protective effects of dexmedetomidine on the liver and remote organs against hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *Int J Surg.* 2013; 11: 96-100.
- [38] **Gur M, Turkoglu C, Taskin A, et al.** Paraoxonase-1 activity and oxidative stress in patients with anterior st elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention with and without no-reflow. *Atherosclerosis.* 2014; 234: 415-20.

5.1 Resultados suplementares

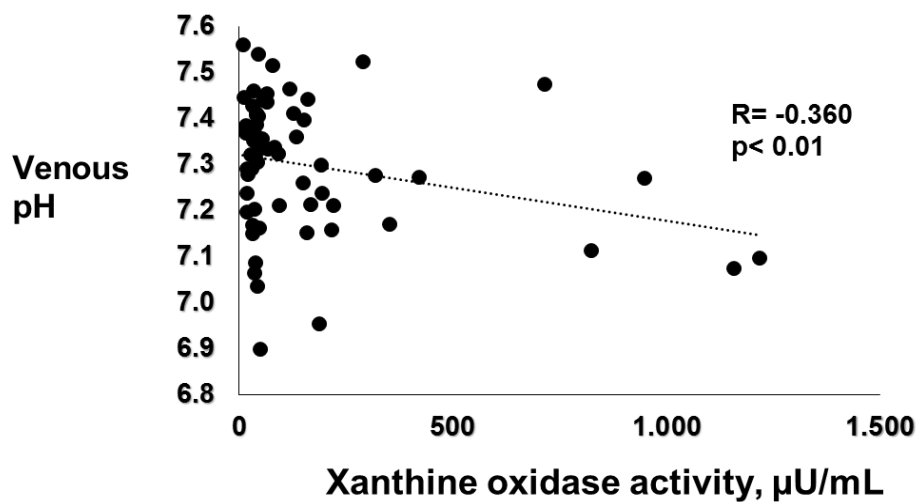


Supl. 1. Spearman's correlation analysis between xanthine oxidase activity and S100B protein levels.

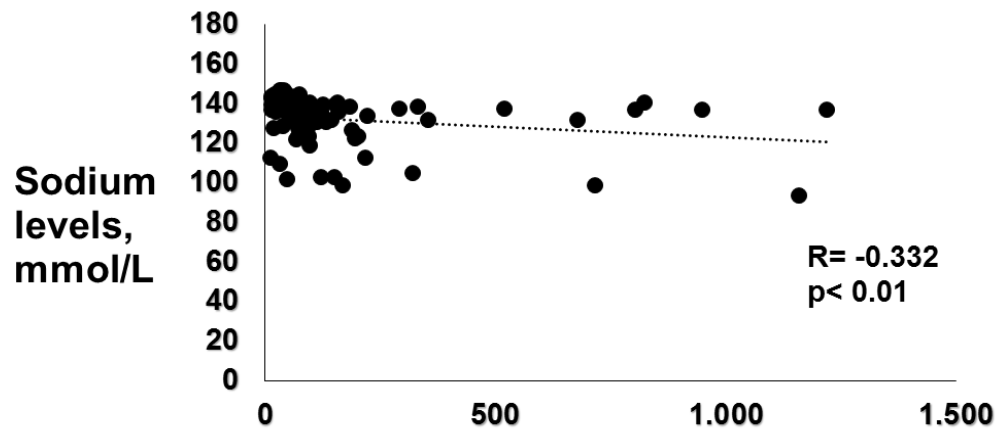
A



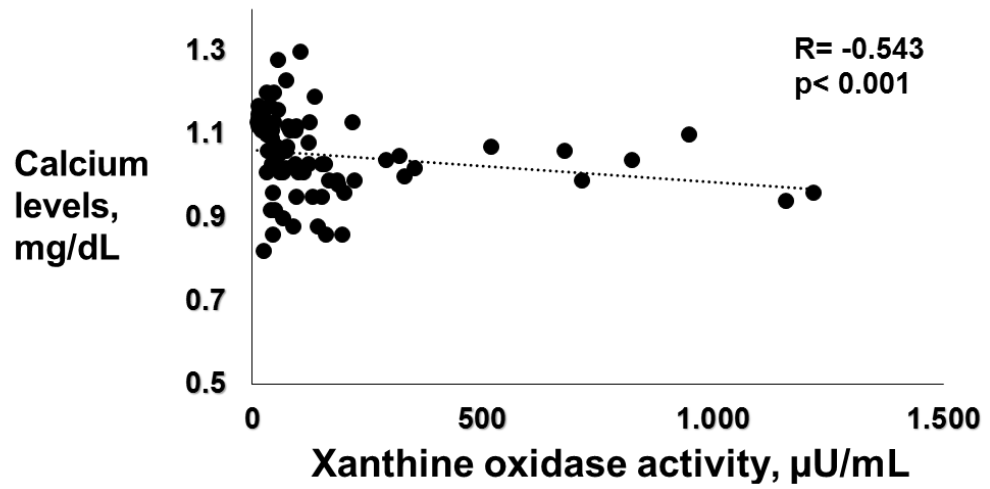
B



C

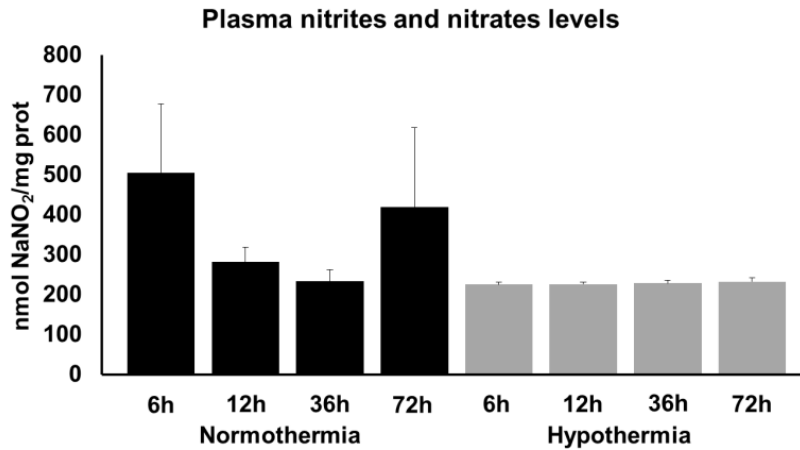


D

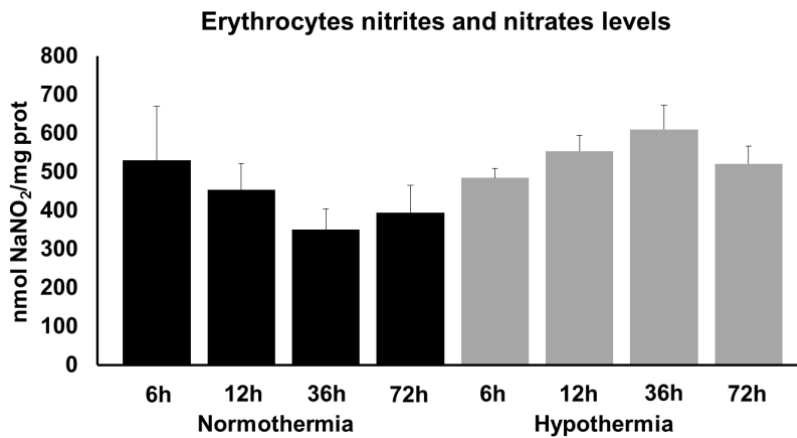


Supl. 2. Spearman's correlation analysis between xanthine oxidase activity and levels of blood lactate (A), venous pH (B), sodium (C) and calcium (D), markers related to acidosis.

A

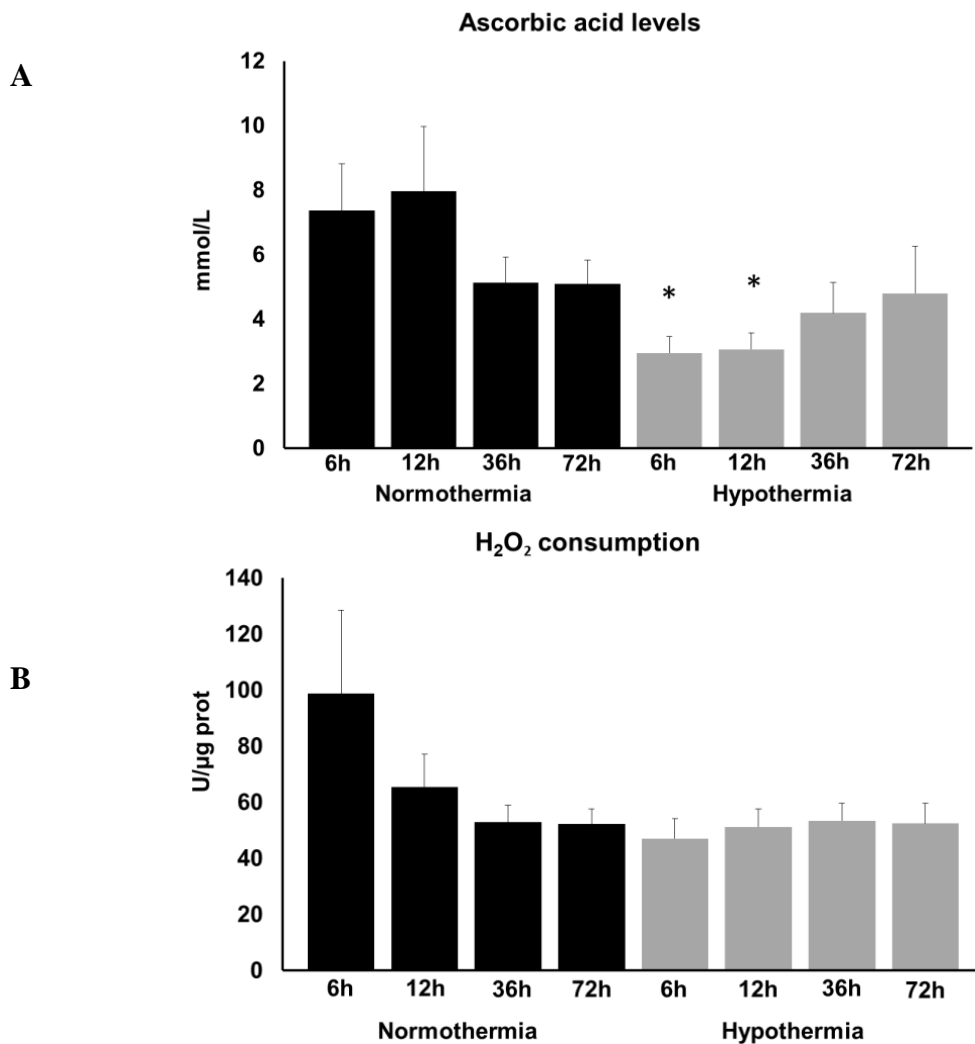


B



Supl. 3. Indirect indicator of nitric oxide (\cdot NO) levels in plasma (A) and erythrocytes (B) 6, 12, 36 and 72 h post-CA comparing normothermic (n=31) and hypothermic (n=11) patients. At 6 and 12 h, patients of hypothermia group had 33 °C of body temperature and 36 °C at 36 and 72 h post-CA.

Method: *Plasma and erythrocytes nitrite/nitrate levels.* Griess reaction was employed to assess total content of \cdot NO, nitrite and nitrate. Standard curve was prepared using sodium nitrite (NaNO_2). Absorbance was obtained by microplate spectrophotometer at 543 nm (Grisham, Johnson e Lancaster, 1996; Bryan e Grisham, 2007).



Supl. 4. Antioxidant levels of serum ascorbic acid (A) and erythrocytes H₂O₂ consumption (B) 6, 12, 36 and 72 h post-CA comparing normothermic (n=31) and hypothermic (n=11) patients. At 6 and 12 h, patients of hypothermia group had 33 °C of body temperature and 36 °C at 36 and 72 h post-CA. Data are expressed as mean ± standard error. *Significantly different comparing groups at the same time, p<0.05.

Method: *Serum Vitamin C (Vit.C).* Antioxidant ascorbic acid (Vit. C) levels were measured by HPLC simultaneously with MDA (Levine, 2002). *H₂O₂ consumption.* Erythrocytes lysate samples used to measure the capability of erythrocytes to detoxify H₂O₂ by spectrophotometry at 240 nm. Activity was calculated using the molar absorption coefficient of H₂O₂ ϵ_{240}^M 40 M⁻¹cm⁻¹ (Kondo e Awada, 2000).

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos o uso da hipotermia terapêutica pós-PCR tornou-se motivo de **controvérsia** (Nolan e Soar, 2011; Walden, Nielsen e Wise, 2011). Mais de 10 anos após a publicação dos clássicos estudos na revista *The New England Journal of Medicine* mostrando melhora no quadro neurológico e sobrevivência de pacientes tratados com hipotermia (Bernard *et al.*, 2002; Holzer *et al.*, 2002), um importante estudo foi publicado reavaliando o tratamento dos pacientes pós-PCR com hipotermia na mesma revista (Nielsen *et al.*, 2013). Estes pacientes, em coma pós-PCR, tiveram sua temperatura controlada a 33 °C durante 24 h e após tiveram sua temperatura controlada a 36 °C, e foram comparados a pacientes que tiveram sua temperatura controlada a 36 °C durante todo o período de internação (950 pacientes no total). Importaneamente, não houve diferença significativa no quadro neurológico durante 180 dias e na sobrevivência 180 e 1000 dias pós-PCR.

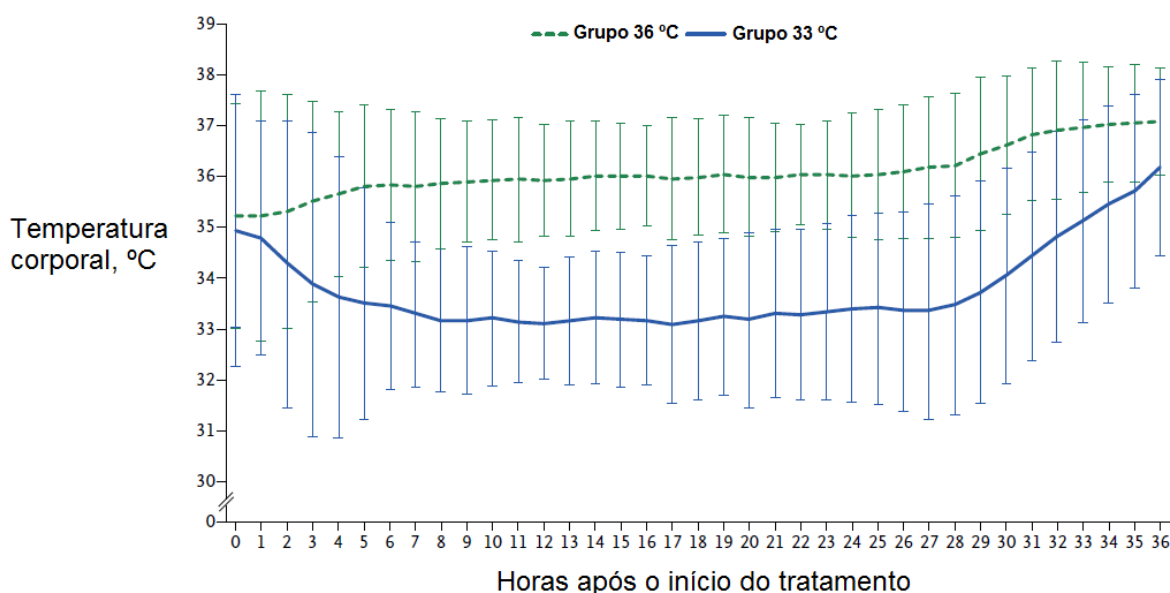


Fig. 11. Temperatura interna em pacientes normotérmicos vs. hipotérmicos pós-parada cardíaca. Modificado de Nielsen *et al.*, 2013.

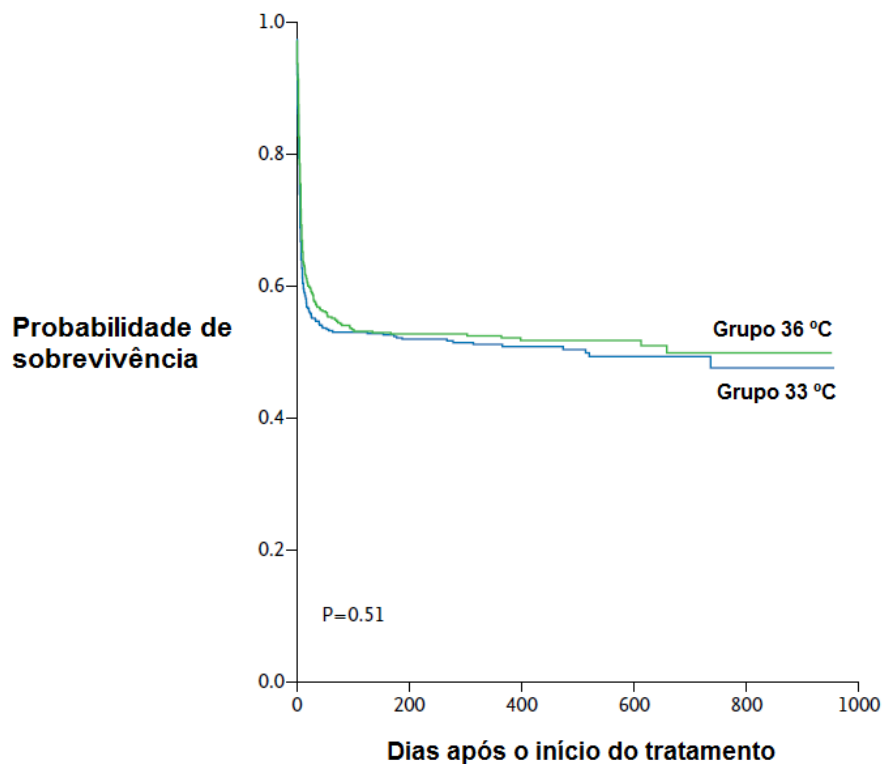


Fig. 12. Sobrevivência em 1000 dias de pacientes normotérmicos vs. hipotérmicos pós-parada cardíaca. Modificado de Nielsen et al., 2013.

Outro estudo envolvendo 290 crianças em coma pós-PCR, a hipotermia terapêutica (33 °C) não resultou em diferença significativa na melhora do quadro motor e na sobrevivência um ano após o evento da PCR em comparação ao grupo normotérmico, com temperatura controlada a 36,8 °C (Moler *et al.*, 2015).

Apesar da controvérsia sobre os benefícios de manter a temperatura corporal dos pacientes em hipotermia leve durante a SPCR, todos os estudos deixam claro que o controle da temperatura corporal é extremamente benéfico para a melhora do quadro dos pacientes internados. É possível que a partir desse momento o tratamento dos pacientes se volte para a estabilização e **manutenção da temperatura dos pacientes em normotermia** a 36 °C do que o tratamento em hipotermia. Além disso, importantes pesquisadores da área

ainda recomendam a manutenção da temperatura a 32-34 °C até que os estudos cheguem a um consenso. É preciso deixar claro que apesar de haver dúvidas em relação à sobrevivência e ao quadro neurológico, a grande maioria dos estudos aponta para a proteção de diferentes tecidos através da hipotermia (Hachimi-Idrissi, Goossens e Van Zanten, 2014). Desta forma, é possível que mesmo que a hipotermia não seja capaz de aumentar as chances de sobrevivência do paciente, ela pode acelerar a recuperação e melhorar o prognóstico dos pacientes sobreviventes. Além disso, é evidente que a hipertermia continua sendo considerada altamente prejudicial, devendo então a temperatura ser mantida sempre a baixo de 37 °C.

Sob uma perspectiva mais abrangente do tratamento de pacientes pós-PCR, podemos ser otimistas em relação aos benefícios do tratamento hoje oferecido. Em cerca de dez anos, período que coincide com o início da instituição da hipotermia como tratamento para a PCR, a expectativa de sobrevivência pós-parada aumentou de 1/3 para 1/2 (Rittenberger e Callaway, 2013). Apesar disso, a taxa de mortalidade em pacientes pós-reanimação ainda é alta, necessitando de novas alternativas de tratamento durante a SPCR.

A própria hipotermia pode ser aplicada de formas alternativas. Por exemplo, a técnica de **hipotermia terapêutica seletiva da cabeça** vem sendo discutida e estudada. Existe um grande interesse nesta técnica por evitar alguns dos efeitos colaterais do resfriamento do corpo inteiro, principalmente em recém-nascidos. Por exemplo, a encefalopatia hipóxico-isquêmica ocorre em 1:500 dos nascimentos e o resfriamento seletivo da cabeça poderia ser mais seguro para estes recém-nascidos. Dentre os poucos estudos nesse sentido, existe uma tendência de que o resfriamento do corpo inteiro traga mais benefícios neurológicos. Porém, esses estudos são muito preliminares, escassos e com um limitado número de recém-nascidos (Allen, 2014).

Como evidenciado na **Fig, 10-c** (pág. 41), a hipotermia terapêutica poderia trazer maiores benefícios aos pacientes caso pudesse ser induzida ainda **durante o período isquêmico**. Desta forma, a hipotermia poderia reduzir o significativo dano oxidativo aos tecidos gerado pela reperfusão. Já houve tentativas clínicas de atingir a hipotermia durante o período isquêmico, porém não foi possível tecnicamente atingir a temperatura-alvo a tempo em todos os pacientes. Nos poucos pacientes em que foi possível induzir a hipotermia antes da reperfusão, houve uma redução significativa na área de infarto do miocárdio (Lampe e Becker, 2011).

Apesar desses exemplos, não existem grandes **variações nos protocolos de hipotermia** aplicados em pacientes, ou mesmo em estudos em modelo animal. A maioria dos estudos até o presente momento utilizou a hipotermia leve (32-34 °C) por 12-24 h. É possível que melhores resultados possam ser obtidos testando-se: diferentes técnicas de indução da hipotermia, seu uso combinado com outros tratamentos, redução do tempo entre o ROSC e o início do tratamento, diferentes temperaturas-alvo, diferentes durações da fase de manutenção da hipotermia e alterações na velocidade de reaquecimento (Nolan *et al.*, 2008). Por exemplo, em modelo experimental em ratos comparando tempos de **24 e 48 h** de hipotermia terapêutica, o maior tempo de tratamento mostrou melhor recuperação do dano neurológico (Che *et al.*, 2011).

Apesar de ainda não serem utilizadas na clínica, **outras terapias** estão sendo estudadas com o objetivo de reduzir os danos causados pela SPCR. Alguns delas estão sendo comparadas com a hipotermia terapêutica, ou até mesmo sendo estudando o efeito combinado entre as novas alternativas e a hipotermia.

Os gases nobres, apesar de terem sido considerados inertes, interagem com o sítio ativo de enzimas e com receptores (Jawad *et al.*, 2009). Por esse motivo, seu efeito

biológico na SPCR está sendo investigado. Além dos gases nobres, outros gases estão sendo estudados como alternativa de tratamento após a parada. A utilização de **terapias potencialmente associáveis à ventilação mecânica** podem trazer grandes benefícios aos pacientes durante a SPCR. Isso se deve ao fato de que a ventilação mecânica já faz parte do tratamento padrão do paciente pós-PCR e é rapidamente iniciada no ambiente intra-hospitalar ou mesmo em unidades móveis. Comparativamente a hipotermia terapêutica, esse tipo de tratamento é mais prático e rápido, e pode ser prontamente induzido.

Dentro desta perspectiva, o gás nobre **argônio (Ar)** pode ser uma opção de tratamento associado à ventilação mecânica pós-PCR. Um modelo experimental de PCR em porcos utilizando 70% Ar/30% O₂ durante 4 h pós-reanimação testou esta alternativa de tratamento. 72 h pós-ROSC os animais tratados, comparados ao grupo controle ventilado com 70% nitrogênio (N₂)/30% O₂, estavam mais alertas e tiveram menor dano neuronal, tanto em análises histológicas quanto nos níveis do marcador de dano neuronal NSE. Porém, o tratamento com Ar não resultou em melhora do dano ao tecido cardíaco, não apresentando redução na área de infarto e nos níveis de hs-cTnT (Ristagno *et al.*, 2014).

O gás **hidrogênio (H₂)** tem sido outra alternativa sob fase de testes. A utilização de 26% O₂ + 1,3% H₂ por 2 h na ventilação mecânica, iniciada 5 min pós-ROSC foi comparada à hipotermia terapêutica durante 2 h a 33 °C, atingida 15 min pós-ROSC em modelo de PCR em ratos. Neste estudo, tanto o tratamento com H₂ quanto a hipotermia terapêutica trouxeram melhora semelhante, de 71,4%, na sobrevivência 7 dias pós-PCR, uma melhora significativa quando comparados aos 38,4% grupo controle. Além disso, o tratamento combinado 26% O₂ + 1,3% H₂ + hipotermia levou à sobrevivência de 85,7%. Resultados semelhantes foram encontrados para o déficit neurológico e dano neuronal,

apresentando sempre resultados mais promissores com o tratamento combinado (Hayashida *et al.*, 2014).

O **ozônio (O₃)** também foi testado em modelo murino e comparado com a hipotermia terapêutica. Tanto a hipotermia terapêutica por 4 h quanto o tratamento com injeção intraperitoneal utilizando 0,7 mg/kg de O₃ reduziram os níveis de MDA e aumentaram a atividade de SOD e GPx pós-I/R. Porém, a hipotermia apresentou melhores resultados, mesmo quando comparado ao tratamento combinado hipotermia + O₃ (Ozkan *et al.*, 2015). É necessário cautela ao se propor tratamentos que administrem O₃, pois é uma espécie reativa que pode apresentar importante toxicidade.

A **administração de drogas** ou outras substâncias, principalmente **antioxidantes**, também podem ser uma opção rápida de tratamento pós-PCR, podendo ser facilmente aplicada em associação com outros tratamentos. Algumas opções estão sendo testadas em modelo animal de PCR, porém com resultados ainda muito preliminares. Por exemplo: a administração do carvedilol, um bloqueador não-seletivo alfa/beta1, utilizado na insuficiência cardíaca e hipertensão foi testado em ratos, reduzindo marcadores de inflamação e apoptose no miocárdio (Yeh *et al.*, 2013); administração de metabólito intermediário piruvato foi testada em modelo porcino, melhorando parâmetros hemodinâmicos (Cherry *et al.*, 2015); o antioxidante tempol reduziu o dano neuronal pós-PCR em ratos (Bai, Wu e Meng, 2015); o tempol e o antioxidante ácido ascórbico também reduziram a peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e a necrose do miocárdio em ratos pós-PCR (Tsai *et al.*, 2011); o *Shenfu injection* (SFI), um derivado de chás tradicionais chineses, rico em ginsenosídeos e utilizado clinicamente no tratamento de doenças cardiovasculares a cerca de 20 anos, mostrou redução de dano pulmonar pós-PCR em porcos (Zhang *et al.*, 2012); dentre outros vários estudos neste sentido durante a SPCR. Porém, ainda são necessários muitos outros estudos pré-clínicos e clínicos para a

introdução de novas terapias aprovadas para serem aplicadas em pacientes pós-parada. Drogas e antioxidantes testados de forma promissora em modelos de I/R também podem ser posteriormente testados em modelos de parada cardíaca.

A indução das defesas antioxidantes endógenas pode contribuir para a proteção do organismo contra os danos consequentes da I/R. Como destacado na **Fig. 13**, o **precondicionamento** pode ser utilizado para induzir as defesas do organismo contra os danos pós-I/R. O precondicionamento pode ser definido como a indução prévia e menos severa da I/R, permitindo que o organismo se adapte aos danos subsequentes (Garcia-Dorado e Piper, 2006). Estudos induzem o precondicionamento em ciclos de I/R, que podem variar de 2 a 25 ciclos, também variando o tempo de isquemia entre os estudos que, além disso, são realizados em diversas espécies animais como modelo, e avaliando diferentes condições patológicas em diferentes tecidos. Essa enorme variação e complexidade torna um grande desafio estabelecer qual seria a melhor forma de utilização do precondicionamento em pacientes, e provavelmente o tratamento só poderia ser aplicado órgão/região-especificamente (Wever *et al.*, 2015) devida a diferenças nos mecanismos de dano e defesa entre os tecidos. Esta técnica baseia-se no conceito de hormese, a adaptação do organismo a uma dose pequena de algum tipo de toxina ou outros estressores, conferindo proteção a doses posteriores maiores.

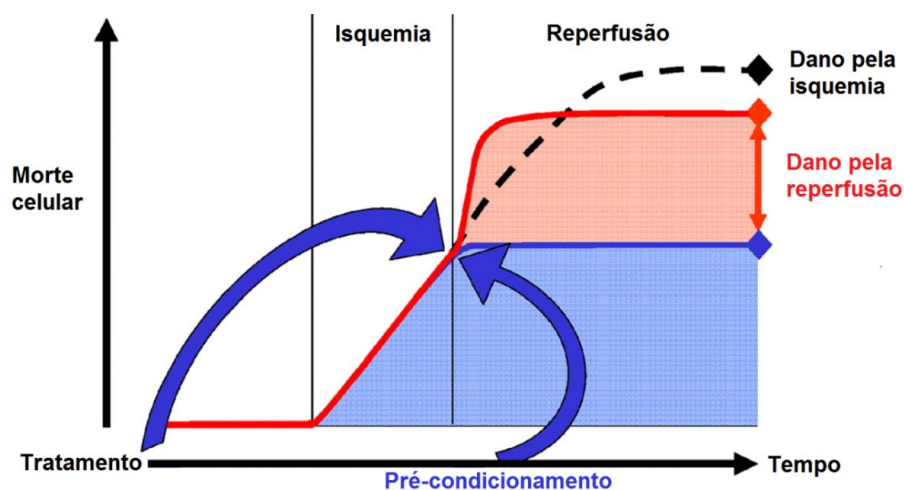


Fig. 13. Participação do tratamento de pré-condicionamento na redução dos danos aos tecidos causados durante a fase de isquemia e durante a fase de reperfusão. Modificado de Garcia-Dorado e Piper, 2006.

Os estudos neste sentido apresentam resultados muito promissores, porém ainda não conseguiram ser transpostos para modelos pré-clínicos ou clínicos de forma satisfatória (Wever *et al.*, 2015). Apesar disso, estudos em modelo animal deixam evidente que um período isquêmico que leva a morte celular (letal) perde a letalidade se este tecido receber um tempo de isquemia prévia menor (não-letal) (Garcia-Dorado e Piper, 2006). Os primeiros estudos foram realizados no miocárdio, um tecido bastante adaptável ao dano oxidativo pós-I/R e que frequentemente apresenta resultados promissores (Murry, Jennings e Reimer, 1986; Rodrigo *et al.*, 2007). Apesar disso, diversos estudos tem testado o condicionamento no cérebro, devida a sua importância no dano pós-I/R, com resultados promissores na proteção deste tecido. É possível que o aumento da expressão e atividade de enzimas relacionadas à proteção contra as espécies reativas participe diretamente do efeito observado nos estudos que aplicam o condicionamento. Por exemplo, estudo utilizou modelos de I/R cerebral em ratos, deixando evidente que o condicionamento também protege este tecido, aumentando as defesas antioxidantes. O condicionamento melhorou o déficit neurológico, reduziu a área de infarto cerebral. Concomitantemente, o condicionamento aumentou a atividade da SOD total no córtex e hipocampo, assim como a atividade e expressão MnSOD. Também, o condicionamento reduziu a atividade da XO e os níveis de MDA (Yuan *et al.*, 2012).

O mecanismo pelo qual o condicionamento ativa as defesas dos tecidos, assim como a resposta celular a I/R podem estar ligadas a ação de **fatores de transcrição** como o fator induzido por hipóxia (HIF, do inglês *hypoxia-inducible factors*) e o fator 2

relacionado a NF-E2 (Nrf2, do inglês *NF-E2-related factor 2*). Apesar disso, esses fatores foram pouco estudados na PCR até o presente momento.

O fator de transcrição HIF é expresso durante a resposta dos tecidos à hipóxia. O HIF interage com elementos responsivos à hipóxia (HRE, do inglês *hypoxia-response element*), alterando a tradução de genes relacionados à angiogênese, proliferação celular, defesa, regulação do pH, metabolismo energético e apoptose. Este fator de transcrição é um heterodímero, e sua subunidade HIF-1 α se acumula pelo bloqueio da degradação em eventos de hipóxia. Em modelo experimental de PCR em ratos foi mostrado que HIF-1 α se acumula no córtex cerebral 1 h após a reanimação, e surpreendentemente se mantém em níveis semelhantes após 7 dias (Chavez e Lamanna, 2002).

O fator de transcrição Nrf2 também tem seus níveis aumentados em resposta à I/R. Ele é um importante regulador da resposta antioxidante, ativando a transcrição dos genes de enzimas como a SOD, GPx, GST, CAT, TRX e GR. Diferente do HIF, o Nrf2 é expresso em resposta à reoxigenação e/ou outros estressores, e sua expressão é ativada quanto maior a concentração de O₂ em modelo de I/R em cultura de células epiteliais (Leonard *et al.*, 2006).

A regulação de fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes relacionados à resposta tecidual a I/R também pode ser um importante alvo de terapias que buscam minimizar os danos durante a SPCR.

7. CONCLUSÕES

A parada cardiorrespiratória é uma emergência médica relacionada a pacientes em graves condições, com uma altíssima taxa de mortalidade. A associação entre as patologias que levam a parada e a síndrome pós-parada cardiorrespiratória dificultam a sua recuperação. O tratamento de pacientes nestas condições tem altos custos para os cidadãos e para o estado, e uma recuperação mais rápida, assim como a amenização dos processos patológicos são imprescindíveis para a redução desses custos e para a melhor recuperação dos pacientes reanimados. O estudo do estresse oxidativo durante a SPCR pode trazer importantes informações sobre a fisiopatologia pós-parada e contribuir para a indicação de novos tratamentos.

Como apresentado no capítulo I, foi estudado o dano oxidativo 2, 4 e 72 h pós-ROSC em modelo experimental de PCR em ratos. Os níveis de 8-OHG, marcador de dano oxidativo em DNA, assim como os níveis de isoprostanos, marcador de dano oxidativo em lipídeos, foram maiores no tecido miocárdico 2 e 4 h pós-ROSC, voltando aos níveis do controle após 72 h. Resultados semelhantes foram encontrados no plasma. Concomitantemente, os níveis de hs-cTnT, marcador de dano miocárdico, no plasma foram maiores 2 e 4 h pós-ROSC, voltando aos níveis do controle após 72 h. A disfunção do miocárdio foi também avaliada, mostrando que o volume de ejeção do ventrículo esquerdo e o débito cardíaco estavam reduzidos 2, 4 e 72 h pós-ROSC. A fração de ejeção apresentou perfil semelhante, estando reduzida 2 e 4 h pós-ROSC, voltando ao perfil do grupo controle após 72 h. A redução da fração de ejeção e o aumento dos níveis de hs-cTnT estavam fortemente correlacionados aos elevados níveis dos dois marcadores de

dano oxidativo avaliados, isoprostanos e 8-OHG, deixando evidente a relação entre o estresse oxidativo e a disfunção do miocárdio durante a SPCR.

Desta forma, os dados obtidos nesse trabalho reforçam a ideia de que o dano oxidativo está fortemente relacionado aos danos aos tecidos sofridos durante o período de isquemia, de reperfusão e da síndrome pós-parada cardiorrespiratória, e deve ser alvo de terapias que tem como objetivo amenizar os danos causados pela parada cardiorrespiratória.

Como apresentado no capítulo II, a hipotermia terapêutica foi estudada em pacientes durante a SPCR, 6, 12, 36 e 72 h pós-ROSC e comparados a pacientes normotérmicos. Essa terapia contribui significativamente para a redução do dano oxidativo nesses pacientes, assim como para a ativação de defesas antioxidantes. A hipotermia reduziu o dano oxidativo em lipídeos, evidenciado pelos níveis de MDA, e o dano em proteínas, evidenciado pelos níveis de grupos carbonila, em pacientes durante a SPCR, 6, 12, 36 e 72 h pós-PCR. É interessante destacar que o tratamento foi iniciado 4-5 h pós-PCR nesses pacientes durante 24 h. Desta forma, o dano oxidativo não foi reduzido apenas durante o período de manutenção do tratamento (6 e 12 h pós-PCR), mas também após o reaquecimento (36 e 72 h pós-PCR). Porém, os níveis de S100B, marcador de dano neuronal, não foram alterados pela hipotermia terapêutica. A atividade da XO, enzima geradora do radical $O_2^{\cdot-}$ durante a I/R, foi menor apenas após o período de reaquecimento (36 e 72 h pós-PCR) nos pacientes hipotérmicos. Além disso, a atividade da XO pode estar correlacionada à acidose pós-I/R. Concomitantemente, a atividade antioxidante das enzimas SOD, GPx e GST em eritrócitos foi maior e da enzima antioxidante sérica PON-1 foi menor nos pacientes hipotérmicos também 6, 12, 36 e 72 h pós-PCR. Isso evidencia que a hipotermia altera a atividade antioxidante, e pode ao menos em parte melhorar as defesas pós-PCR. Porém, assim como os novos estudos sobre a hipotermia terapêutica

apontam, a sobrevivência em longo prazo (após 3 anos) foi semelhante entre os pacientes normotérmicos e hipotérmicos na população analisada.

Apesar da controvérsia e dúvidas levantadas pela comunidade científica sobre a eficiência da hipotermia terapêutica em aumentar a sobrevivência de pacientes que sofreram parada cardiorrespiratória, esta terapia pode reduzir o dano da I/R aos tecidos, evitando o estresse oxidativo e consequentes rotas de apoptose e necrose. A hipotermia apresenta eficiência parcial na redução desses danos e, por esse motivo, modificações nos protocolos de hipotermia terapêutica e a associação da hipotermia com outras terapias são essenciais para a melhora do quadro dos pacientes reanimados pós-PCR.

8. PERSPECTIVAS

A hipotermia terapêutica não deve ser prematuramente desacreditada pelas UTIs e pesquisadores. Diferentes protocolos de hipotermia terapêutica ainda podem ser testados em diferentes populações, principalmente em associação a outras terapias. A extensão do tempo de manutenção da hipotermia a 32-34 °C por um maior período de tempo, como 48 h (Che *et al.*, 2011), assim como manutenção do controle da temperatura normotérmica a 36 °C durante as primeiras 72 h pós-PCR, são protocolos que podem ser testados no futuro. As fortes evidências da relação entre o dano oxidativo e o dano aos tecidos pós-parada cardíaca mostram que a hipotermia poderia ser associada à administração de antioxidantes. Os antioxidantes ácido lipoico e ômega-3 têm apresentado resultados promissores na diminuição do dano oxidativo em outros modelos, e poderia ser testado em modelos de PCR (Luo *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2015). Além disso, terapias aplicadas através da ventilação mecânica podem trazer grandes vantagens pela facilidade e agilidade na iniciação do tratamento. Também, o condicionamento pode ser uma alternativa viável, podendo ser aplicadas em associação à hipotermia ou outras terapias.

9. ANEXOS

Anexo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Seu familiar está sendo convidado a participar de uma pesquisa acadêmica do Laboratório de Estresse Oxidativo - Departamento de Biofísica - UFRGS, em Associação com o Grupo Hospitalar Conceição e o Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com o nome: **“Pós-parada cardiorrespiratória e hipotermia terapêutica: estudo da síndrome de isquemia-reperfusão através do dano oxidativo em ácidos nucléicos e enzimas antioxidantes”**, e tem como objetivo principal estudar a parada cardiorrespiratória. O tema escolhido se justifica pela importância do tratamento dos pacientes após a ocorrência da parada cardiorrespiratória. O trabalho está sendo realizado sob a supervisão e orientação das professoras Dra. Silvia Regina Rios Vieira do Grupo de Pesquisa em Cardiologia – HCPA, e Dra. Mara da Silveira Benfato da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

INFORMAÇÃO: A parada cardiorrespiratória é a situação clínica onde o paciente não apresenta batimento cardíaco, ou seja, o coração e a respiração deixam de funcionar, levando à parada de funcionamento dos outros órgãos. Os mais prejudicados são o cérebro e o coração. Os mecanismos que causam esses danos ainda não são bem entendidos, mas sabe-se que isto está relacionado com mudanças nas defesas das células. Este estudo pretende identificar os mecanismos envolvidos com essas defesas para melhorar o tratamento e possivelmente a recuperação do paciente. O material biológico a ser usado na pesquisa será sangue, obtido do cateter central do paciente (não será “picado”), o qual é um procedimento de rotina realizado em qualquer unidade de tratamento intensivo, sem danos ao paciente.

Procedimento do Estudo: As coletas serão realizadas 6h, 12h, 36h e 72h após a parada cardiorrespiratória. Após a coleta as amostras serão encaminhadas para o Laboratório de Estresse Oxidativo, no Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para análise.

Benefícios: Os benefícios incluem o melhor conhecimento da parada cardiorrespiratória, melhorando o tratamento de pessoas afetadas por este evento.

Custo: A participação no estudo **não** gera custo ao paciente ou familiar.

Os dados de identificação serão confidenciais e os nomes reservados.

Os dados obtidos serão utilizados somente para este estudo, sendo os mesmos armazenados pelo(a) pesquisador(a) principal durante 5 (cinco) anos e após totalmente destruídos (conforme preconiza a Resolução 196/96).

EU _____, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar do estudo.

Declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa;
- De que minha participação é voluntária e terei a liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal e nem para o atendimento prestado a mim;
- Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa;
- Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com a pesquisadora Dra. Silvia Regina Rios Vieira do Grupo de Pesquisa em Cardiologia – HCPA, pelo telefone (51)3359 8634, email: srvieira@terra.com.br ou com a Dra. Mara da Silveira Benfato, telefone (51)3308 7603, email: mara.benfato@ufrgs.br.
- Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com a pesquisadora.

Porto Alegre, ____, de _____ de 20__.

Assinatura do entrevistado

Assinatura da pesquisadora

Nome do entrevistado:

Nome da pesquisadora:

Se familiar analfabeto:

Este formulário foi lido para

_____, familiar do paciente
_____(nome do paciente) em
_____/_____/_____(data) pelo _____ (nome do pesquisador)
enquanto eu estava presente.

Obs.: não esquecer de colocar campo de assinatura da testemunha, nome e data.

Assinatura da Testemunha

Nome:

Data: ____/____/____

Anexo II

Dados dos pacientes pós-parada no momento da coleta das amostras de sangue e gasometria

Paciente n^o: _____

Dados Pessoais

Nome: _____ Idade: _____

Sexo: _____ Origem étnica: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

SINAIS VITAIS

	6h pós-parada	12h pós-parada	36h pós-parada	72h pós-parada
PA				
FC				
FR				
Sat O ₂				
Temperatura				

Protocolo de hipotermia? () Sim () Não

Obs.:

Medicações em uso:

10. REFERÊNCIAS

AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2005 American Heart Association guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care Part 1: Introduction. **Circulation**, v. 112, n. 24, p. IV1-IV203, Dec 13 2005. ISSN 0009-7322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233902000001 >.

ABDEL-GABER, S. A. et al. Effect of selective versus non-selective cyclooxygenase inhibitors on ischemia-reperfusion-induced hepatic injury in rats. **Life Sciences**, v. 134, p. 42-48, Aug 1 2015. ISSN 0024-3205. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000358025600007 >.

ALLEN, K. A. Moderate hypothermia: is selective head cooling or whole body cooling better? **Advanced Neonatal Care**, v. 14, p. 113–118, 2014.

ANGELOS, M. G. et al. Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 1, p. H341-H347, Jan 2006. ISSN 0363-6135. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000234148200041 >.

BAI, D.; WU, X.; MENG, L. Effect of tempol on cerebral resuscitation caused by asphyxia-induced cardiac arrest. **Acta Cardiologica Sinica**, v. 31, n. 2, p. 158-163, Mar 2015. ISSN 1011-6842. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000351799100010 >.

BALAN, I. S. et al. Oximetry-guided reoxygenation improves neurological outcome after experimental cardiac arrest. **Stroke**, v. 37, n. 12, p. 3008-3013, Dec 2006. ISSN 0039-2499. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243411500036 >.

BATTELLI, M. G.; BOLOGNESI, A.; POLITO, L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 9, p. 1502-1517, Sep 2014. ISSN 0925-4439. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000340975400022 >.

BENJAMIN, E. et al. Venous hypercarbia in canine hemorrhagic-shock. **Critical Care Medicine**, v. 15, n. 5, p. 516-518, May 1987. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987H191300013 >.

BERNARD, S. A. et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 8, p. 557-563, Feb 21 2002. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000173926700003 >.

BEYERSDORF, F. The use of controlled reperfusion strategies in cardiac surgery to minimize ischaemia/reperfusion damage. **Cardiovascular Research**, v. 83, n. 2, p. 262-

268, Jul 15 2009. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267440800011 >.

BOLLI, R. Basic and clinical aspects of myocardial stunning. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 40, n. 6, p. 477-516, May-Jun 1998. ISSN 0033-0620. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000074313200001 >.

BOLLI, R.; PATEL, B. Factors that determine the occurrence of reperfusion arrhythmias. **American Heart Journal**, v. 115, n. 1, p. 20-29, Jan 1988. ISSN 0002-8703. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988L592200004 >.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976BU74400029 >.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645-657, 2007. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248679500001 >.

BULUT, S. et al. Successful out-of-hospital cardiopulmonary resuscitation: what is the optimal in-hospital treatment strategy? **Resuscitation**, v. 47, n. 2, p. 155-161, Oct 2000. ISSN 0300-9572. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089703900008 >.

CAI, W.-F. et al. CXCR4 attenuates cardiomyocytes mitochondrial dysfunction to resist ischaemia-reperfusion injury. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 19, n. 8, p. 1825-1835, Aug 2015. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000358925100007 >.

CELES, M. R. N. et al. Increased sarcolemmal permeability as an early event in experimental septic cardiomyopathy: a potential role for oxidative damage to lipids and proteins. **Shock**, v. 33, n. 3, p. 322-331, Mar 2010. ISSN 1073-2322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275197900015 >.

CHAVEZ, J. C.; LAMANNA, J. C. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: Potential role of insulin-like growth factor-1. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 20, p. 8922-8931, Oct 15 2002. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178686600017 >.

CHE, D. et al. Impact of therapeutic hypothermia onset and duration on survival, neurologic function, and neurodegeneration after cardiac arrest. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 6, p. 1423-1430, Jun 2011. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290715000028 >.

CHERRY, B. H. et al. Pyruvate stabilizes electrocardiographic and hemodynamic function in pigs recovering from cardiac arrest. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 12, p. 1774-1784, Dec 2015. ISSN 1535-3702. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000366000500026 >.

COLBOURNE, F.; LI, H.; BUCHAN, A. M. Indefatigable CA1 sector neuroprotection with mild hypothermia induced 6 hours after severe forebrain ischemia in rats. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, n. 7, p. 742-749, Jul 1999. ISSN 0271-678X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000084948800003 >.

CUZZOCREA, S. et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 135-159, Mar 2001. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166966200007 >.

DALEN, M. L. et al. Resuscitation with 100% oxygen increases injury and counteracts the neuroprotective effect of therapeutic hypothermia in the neonatal rat. **Pediatric Research**, v. 71, n. 3, p. 247-252, Mar 2012. ISSN 0031-3998. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000300483600004 >.

DAYOUB, H. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis - Genetic and physiological evidence. **Circulation**, v. 108, n. 24, p. 3042-3047, Dec 16 2003. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000187286300018 >.

DENG, H. et al. Alpha-lipoic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 5, p. 3659-3665, May 2015. ISSN 1791-2997. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000353849500064 >.

DI BARI, M. et al. Cardiopulmonary resuscitation of older, in-hospital patients: Immediate efficacy and long-term outcome. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 7, p. 2320-2325, Jul 2000. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088315300021 >.

DOHI, K. et al. Status of systemic oxidative stress during therapeutic hypothermia in patients with post-cardiac arrest syndrome. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013 2013. ISSN 1942-0900. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000324196300001 >.

DONNINO, M. W. et al. Effective lactate clearance is associated with improved outcome in post-cardiac arrest patients. **Resuscitation**, v. 75, n. 2, p. 229-234, Nov 2007. ISSN 0300-9572. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000251627700006 >.

ECKERSON, H. W.; WYTE, C. M.; LADU, B. N. The human-serum paraoxonase arylesterase polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 35, n. 6, p. 1126-

1138, 1983. ISSN 0002-9297. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1983RU70500008 >.

ERICKSON, J. R. et al. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. **Cell**, v. 133, n. 3, p. 462-474, May 2 2008. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255503900017 >.

GARCIA-DORADO, D.; PIPER, H. M. Postconditioning: reperfusion of "reperfusion injury" after hibernation. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 1, p. 1-3, Jan 2006. ISSN 0008-6363. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000234743300001 >.

GIELIS, J. F. et al. Longitudinal quantification of radical bursts during pulmonary ischaemia and reperfusion. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 48, n. 4, p. 622-628, Oct 2015. ISSN 1010-7940. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000362821600028 >.

GINSBERG, M. D. et al. Therapeutic modulation of brain temperature - relevance to ischemic brain injury. **Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews**, v. 4, n. 3, p. 189-225, Fal 1992. ISSN 1040-8827. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992JL43600001 >.

GONG, P. et al. Mild hypothermia attenuates mitochondrial oxidative stress by protecting respiratory enzymes and upregulating MnSOD in a pig model of cardiac arrest. **Plos One**, v. 7, n. 4, Apr 20 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000305339200054 >.

GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER, J. R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase**, v. 268, p. 237-246, 1996. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996BG02D00023 >.

GUR, M. et al. Paraoxonase-1 activity and oxidative stress in patients with anterior ST elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention with and without no-reflow. **Atherosclerosis**, v. 234, n. 2, p. 415-420, Jun 2014. ISSN 0021-9150. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000336439000026 >.

HACHIMI-IDRISSI, S. et al. Mild hypothermia induced by a helmet device: a clinical feasibility study. **Resuscitation**, v. 51, n. 3, p. 275-281, Dec 2001. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000173088700009 >.

HACHIMI-IDRISSI, S.; GOOSSENS, J.; VAN ZANTEN, A. R. H. Hypothermia or normothermia after cardiac arrest? Do not throw the baby out with the bath water? **Internal and Emergency Medicine**, v. 9, n. 7, p. 785-787, Oct 2014. ISSN 1828-0447. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000343212600011 >.

HACKENHAAR, F. S. et al. Relationship between post-cardiac arrest myocardial oxidative stress and myocardial dysfunction in the rat. **Journal of Biomedical Science**, v. 21, Aug 19 2014. ISSN 1021-7770. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000341050200001 >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford-UK: Oxford University Press. 5th edition 2015.

HAY, A. W. et al. Therapeutic hypothermia in comatose patients after out-of-hospital cardiac arrest. **Anaesthesia**, v. 63, n. 1, p. 15-19, Jan 2008. ISSN 0003-2409. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000251502300003 >.

HAYASHIDA, K. et al. Hydrogen inhalation during normoxic resuscitation improves neurological outcome in a rat model of cardiac arrest independently of targeted temperature management. **Circulation**, v. 130, n. 24, p. 2173-2180, Dec 9 2014. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000346141900015 >.

HOLZER, M. et al. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest (vol 346, pg 549, 2002). **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 22, p. 1756-1756, May 30 2002. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175834100029 >.

HUANG, C.-H. et al. Activation of mitochondrial STAT-3 and reduced mitochondria damage during hypothermia treatment for post-cardiac arrest myocardial dysfunction. **Basic Research in Cardiology**, v. 110, n. 6, Nov 2015. ISSN 0300-8428. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000365175600007 >.

JAWAD, N. et al. Neuroprotection (and lack of neuroprotection) afforded by a series of noble gases in an in vitro model of neuronal injury. **Neuroscience Letters**, v. 460, n. 3, p. 232-236, Sep 4 2009. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268124700010 >.

JURMANN, M. J. et al. Pulmonary reperfusion injury - evidence for oxygen-derived free-radical mediated damage and effects of different free-radical scavengers. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 4, n. 12, p. 665-670, 1990 1990. ISSN 1010-7940. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990EP51500007 >.

KARATEPE, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. **Lc Gc North America**, p. 104-106, Jun 2004. ISSN 1527-5949. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222083500061 >.

KARIMOVA, A.; PINSKY, D. J. The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. **Intensive Care Medicine**, v. 27, n. 1, p. 19-31, Jan 2001. ISSN 0342-4642. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166897700006 >.

KAZAURE, H. S.; ROMAN, S. A.; SOSA, J. A. Epidemiology and outcomes of in-hospital cardiopulmonary resuscitation in the United States, 2000-2009. **Resuscitation**, v. 84, n. 9, p. 1255-1260, Sep 2013. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000324104900039 >.

KEENAN, S. P. et al. Variation in length of intensive care unit stay after cardiac arrest: Where you are is as important as who you are. **Critical Care Medicine**, v. 35, n. 3, p. 836-841, Mar 2007. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000244470800021 >.

KHAMBATA, R. S.; GHOSH, S. M.; AHLUWALIA, A. "Repurposing" of xanthine oxidoreductase as a nitrite reductase: a new paradigm for therapeutic targeting in hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 4, p. 340-353, Aug 1 2015. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000363895200005 >.

KIM, F. et al. Pilot randomized clinical trial of prehospital induction of mild hypothermia in out-of-hospital cardiac arrest patients with a rapid infusion of 4 degrees C normal saline. **Circulation**, v. 115, n. 24, p. 3064-3070, Jun 19 2007. ISSN 0009-7322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247350200007 >.

KLEINBONGARD, P. et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 7, p. 790-796, 2003. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185520900010 >.

KLIEGEL, A. et al. Serial lactate determinations for prediction of outcome after cardiac arrest. **Medicine**, v. 83, n. 5, p. 274-279, Sep 2004. ISSN 0025-7974. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223943700002 >.

KONDO, T.; AWADA, F. **Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogens Species**: 57 – 60 p. 2000.

KUBOYAMA, K. et al. Delay in cooling negates the beneficial effect of mild resuscitative cerebral hypothermia after cardiac-arrest in dogs - a prospective, randomized study. **Critical Care Medicine**, v. 21, n. 9, p. 1348-1358, Sep 1993. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993LW85700019 >.

LAMPE, J. W.; BECKER, L. B. State of the art in therapeutic hypothermia. **Annual Review of Medicine**, Vol 62, 2011, v. 62, p. 79-93, 2011. ISSN 0066-4219. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000287956900007 >.

LAVIER, S. et al. Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest. **Intensive Care Medicine**, v. 30, n. 11, p. 2126-2128, Nov 2004. ISSN 0342-4642. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224956000021 >.

LEITE, M. C. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 93-99, Mar 30 2008. ISSN 0165-0270. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254681100012 >.

LEON, K. et al. Effect of induced mild hypothermia on acid-base balance during experimental acute sepsis in rats. **Therapeutic Hypothermia and Temperature Management**, v. 5, n. 3, p. 163-170, Sep 1 2015. ISSN 2153-7658. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000361109600009 >.

LEONARD, M. O. et al. Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury. **FASEB Journal**, v. 20, n. 14, p. 2624-+, Dec 2006. ISSN 0892-6638. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242490700045 >.

LEVINE, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 790-796, May 1 2002. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175291200002 >.

LEYPOLDT, F. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 transgenic mice are not protected from ischemic stroke. **Plos One**, v. 4, n. 10, Oct 7 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000270594000009 >.

LI, J. et al. The effects of propofol on mitochondrial dysfunction following focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. **Neuropharmacology**, v. 77, p. 358-368, Feb 2014. ISSN 0028-3908. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000330490000037 >.

LI, Y. et al. Preserved heart rate variability during therapeutic hypothermia correlated to 96 hrs neurological outcomes and survival in a pig model of cardiac arrest. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 2, p. 580-586, Feb 2012. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000299313500029 >.

LUO, C. et al. Enriched endogenous omega-3 fatty acids in mice protect against global ischemia injury. **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 7, p. 1288-1297, Jul 2014. ISSN 0022-2275. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000338017400009 >.

MAKINO, J. et al. A quantitative analysis of the acidosis of cardiac arrest: a prospective observational study. **Critical Care**, v. 9, n. 4, p. R357-R362, Aug 2005. ISSN 1466-609X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000232151500011 >.

MAXWELL, S. R. J.; LIP, G. Y. H. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. **International Journal of Cardiology**, v. 58, n. 2, p. 95-117, Jan 31 1997. ISSN 0167-5273. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997WH16800001 >.

MOLER, F. W. et al. Therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest in children. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 20, p. 1898-1908, May 14 2015. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000354493300005 >.

MORI, K. et al. A multivariate analysis of prognostic factors in survivors of out-of-hospital cardiac arrest with brain hypothermia therapy. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 12, p. A168-A168, Dec 2000. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166212200509 >.

MUKHOPADHYAY, P. et al. Mitochondrial reactive oxygen species generation triggers inflammatory response and tissue injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: Therapeutic potential of mitochondrially targeted antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 5, p. 1123-1138, Sep 1 2012. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000308624700011 >.

MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia - a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, v. 74, n. 5, p. 1124-1136, Nov 1986. ISSN 0009-7322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1986E641400029 >.

NADKARNI, V. M. et al. First documented rhythm and clinical outcome from in-hospital cardiac arrest among children and adults. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 295, n. 1, p. 50-57, Jan 4 2006. ISSN 0098-7484. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000234381100020 >.

NEGOVSKY, V. A. The second step in resuscitation-the treatment of the post-resuscitation disease (Reprinted from Resuscitation, vol 1, pg 1-7, 1972). **Resuscitation**, v. 83, n. 10, p. 1187-1190, Oct 2012. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000309050600015 >.

NEUMAR, R. W. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. **Annals of Emergency Medicine**, v. 36, n. 5, p. 483-506, Nov 2000. ISSN 0196-0644. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000165619400012 >.

NIELSEN, N. et al. Adverse events and their relation to mortality in out-of-hospital cardiac arrest patients treated with therapeutic hypothermia. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 1, p. 57-64, Jan 2011. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000285579600010 >.

_____. Targeted Temperature management at 33 degrees C versus 36 degrees C after cardiac arrest. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 23, p. 2197-2206, Dec 5 2013. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000327801100006 >.

NOLAN, J. P. et al. Post-cardiac arrest syndrome: Epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication A scientific statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. **Resuscitation**, v. 79, n. 3, p. 350-379, Dec 2008. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000262051700004 >.

NOLAN, J. P.; SOAR, J. Does the evidence support the use of mild hypothermia after cardiac arrest? Yes. **British Medical Journal**, v. 343, Sep 23 2011. ISSN 0959-535X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295323500001 >.

O'CONNOR, R. E. et al. Part 9: Acute coronary syndromes 2015 american heart association guidelines update for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care. **Circulation**, v. 132, n. 18, p. S483-S500, Nov 3 2015. ISSN 0009-7322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000365552800009 >.

ODDO, M. et al. From evidence to clinical practice: Effective implementation of therapeutic hypothermia to improve patient outcome after cardiac arrest. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 7, p. 1865-1873, Jul 2006. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000238639300001 >.

OKU, K. et al. Cerebral and systemic arteriovenous oxygen monitoring after cardiac-arrest - inadequate cerebral oxygen delivery. **Resuscitation**, v. 27, n. 2, p. 141-152, Mar 1994. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994NJ12900007 >.

ORBAN, J.-C. et al. Assessment of muscle tissue oxygen saturation after out-of-hospital cardiac arrest. **Journal of Critical Care**, v. 30, n. 6, p. 1184-1189, Dec 2015. ISSN 0883-9441. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000363945900007 >.

ORNATO, J. P. et al. Rapid change in pulmonary vascular hemodynamics with pulmonary-edema during cardiopulmonary resuscitation. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 3, n. 2, p. 137-142, 1985 1985. ISSN 0735-6757. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985AEB7400009 >.

OSTADAL, P. et al. Mild therapeutic hypothermia is superior to controlled normothermia for the maintenance of blood pressure and cerebral oxygenation, prevention of organ damage and suppression of oxidative stress after cardiac arrest in a porcine model. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, May 20 2013. ISSN 1479-5876. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000320047800001 >.

OZKAN, H. et al. Evaluation and comparison of the effect of hypothermia and ozone on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 196, n. 2, p. 313-319, Jun 15 2015. ISSN 0022-4804. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000355103700016 >.

PETRIE, J. et al. Hospital costs of out-of-hospital cardiac arrest patients treated in intensive care; a single centre evaluation using the national tariff-based system. **Bmj Open**, v. 5, n. 4, 2015 2015. ISSN 2044-6055. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000352143400012 >.

RICHARDS, E. M. et al. Hyperoxic reperfusion after global ischemia decreases hippocampal energy metabolism. **Stroke**, v. 38, n. 5, p. 1578-1584, May 2007. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245919500027 >.

RISTAGNO, G. et al. Postresuscitation treatment with argon improves early neurological recovery in a porcine model of cardiac arrest. **Shock**, v. 41, n. 1, p. 72-78, Jan 2014. ISSN 1073-2322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000336209200011 >.

RITTENBERGER, J. C.; CALLAWAY, C. W. Temperature management and modern post-cardiac arrest care. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 23, p. 2262-2263, Dec 5 2013. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000327801100014 >.

RIVERS, E. P. et al. The clinical implications of continuous central venous oxygen-saturation during human CPR. **Annals of Emergency Medicine**, v. 21, n. 9, p. 1094-1101, Sep 1992. ISSN 0196-0644. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992JL13800007 >.

_____. Venous hyperoxia after cardiac-arrest - characterization of a defect in systemic oxygen utilization. **Chest**, v. 102, n. 6, p. 1787-1793, Dec 1992. ISSN 0012-3692. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992KB48500032 >.

RODRIGO, R. et al. Non-hypoxic preconditioning of myocardium against postoperative atrial fibrillation: Mechanism based on enhancement of the antioxidant defense system. **Medical Hypotheses**, v. 69, n. 6, p. 1242-1248, 2007 2007. ISSN 0306-9877. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000251487400018 >.

RUIZ-BAILEN, M. et al. Reversible myocardial dysfunction after cardiopulmonary resuscitation. **Resuscitation**, v. 66, n. 2, p. 175-181, Aug 2005. ISSN 0300-9572. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000231347700011 >.

SAFAR, P. Resuscitation from clinical death - pathophysiologic limits and therapeutic potentials. **Critical Care Medicine**, v. 16, n. 10, p. 923-941, Oct 1988. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988Q354400003 >.

SAFAR, P. et al. Improved cerebral resuscitation from cardiac arrest in dogs with mild hypothermia plus blood flow promotion. **Stroke**, v. 27, n. 1, p. 105-113, Jan 1996. ISSN 0039-2499. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996TN25400021 >.

SAGALYN, E. et al. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest in clinical practice: Review and compilation of recent experiences. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 7, p. S223-S226, Jul 2009. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000267245500005 >.

SANDER, M. et al. Agreement of central venous saturation and mixed venous saturation in cardiac surgery patients. **Intensive Care Medicine**, v. 33, n. 10, p. 1719-1725, Oct 2007. ISSN 0342-4642. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000249649100009 >.

SANDRONI, C. et al. In-hospital cardiac arrest: survival depends mainly on the effectiveness of the emergency response. **Resuscitation**, v. 62, n. 3, p. 291-297, Sep 2004. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223809100006 >.

SCIRICA, B. M. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. **Circulation**, v. 127, n. 2, p. 244-250, Jan 15 2013. ISSN 0009-7322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000313637200021 >.

SHINOZAKI, K. et al. Serum S-100B is superior to neuron-specific enolase as an early prognostic biomarker for neurological outcome following cardiopulmonary resuscitation. **Resuscitation**, v. 80, n. 8, p. 870-875, Aug 2009. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000268862100007 >.

SHOEMAKER, W. C.; APPEL, P. L.; KRAM, H. B. Tissue oxygen debt as a determinant of lethal and nonlethal postoperative organ failure. **Critical Care Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1117-1120, Nov 1988. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988Q887200007 >.

STAMMET, P. et al. Neuron-specific enolase as a predictor of death or poor neurological outcome after out-of-hospital cardiac arrest and targeted temperature management at 33 degrees C and 36 degrees C (vol 65, pg 2104, 2015). **Journal of the American College of Cardiology**, v. 66, n. 8, p. 983-983, Aug 25 2015. ISSN 0735-1097. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000359953500022 >.

STARODUB, R. et al. Association of serum lactate and survival outcomes in patients undergoing therapeutic hypothermia after cardiac arrest. **Resuscitation**, v. 84, n. 8, p. 1078-1082, Aug 2013. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000324103800026 >.

STEPHENSON, H. E.; REID, L. C.; HINTON, J. W. Some common denominators in 1200 cases of cardiac arrest. **Annals of Surgery**, v. 137, n. 5, p. 731-744, 1953 1953. ISSN 0003-4932. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1953UE74600015 >.

STERZ, F. et al. Mild hypothermic cardiopulmonary-resuscitation improves outcome after prolonged cardiac-arrest in dogs. **Critical Care Medicine**, v. 19, n. 3, p. 379-389, Mar 1991. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991FC03400015 >.

STUEHLINGER, M. C. et al. Asymmetric dimethyl l-arginine (ADMA) is a critical regulator of myocardial reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 2, p. 417-425, Jul 15 2007. ISSN 0008-6363. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248296300022 >.

TEKIN, I. O. et al. Low-density lipoproteins oxidized after intestinal ischemia/reperfusion in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 157, n. 1, p. E47-E54, Nov 2009. ISSN 0022-4804. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000207944900007 >.

TESTORI, C. et al. Mild therapeutic hypothermia is associated with favourable outcome in patients after cardiac arrest with non-shockable rhythms. **Resuscitation**, v. 82, n. 9, p. 1162-1167, Sep 2011. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000294910200014 >.

TSAI, M.-S. et al. Ascorbic acid mitigates the myocardial injury after cardiac arrest and electrical shock. **Intensive Care Medicine**, v. 37, n. 12, p. 2033-2040, Dec 2011. ISSN 0342-4642. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297155300018 >.

_____. Prolonged cooling duration mitigates myocardial and cerebral damage in cardiac arrest. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 33, n. 10, p. 1374-1381, Oct 2015. ISSN 0735-6757. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000361839300009 >.

TSUCHIDA, S. **Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogens species: 83 – 85 p. 2000.**

TUFEK, A. et al. The protective effects of dexmedetomidine on the liver and remote organs against hepatic ischemia reperfusion injury in rats. **International Journal of Surgery**, v. 11, n. 1, p. 96-100, 2013 2013. ISSN 1743-9191. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316936600021 >.

TUREDİ, S. et al. Investigation of the possibility of using ischemia-modified albumin as a novel and early prognostic marker in cardiac arrest patients after cardiopulmonary resuscitation. **Resuscitation**, v. 80, n. 9, p. 994-999, Sep 2009. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273017100009 >.

VAN HIMBERGEN, T. M. et al. Indications that paraoxonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 3, p. 445-451, 2005. ISSN 0022-2275. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227450900007 >.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction - the first step toward coronary arteriosclerosis. **Circulation Journal**, v. 73, n. 4, p. 595-601, Apr 2009. ISSN 1346-9843. Disponível em: <<Go to ISI>://000264733000001 >.

VERECZKI, V. et al. Normoxic resuscitation after cardiac arrest protects against hippocampal oxidative stress, metabolic dysfunction, and neuronal death. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 26, n. 6, p. 821-835, Jun 2006. ISSN 0271-678X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000237752200009 >.

VERMA, S. et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. **Circulation**, v. 105, n. 20, p. 2332-2336, May 21 2002. ISSN 0009-7322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175853600003 >.

WALDEN, A. P.; NIELSEN, N.; WISE, M. P. Does the evidence support the use of mild hypothermia after cardiac arrest? No. **British Medical Journal**, v. 343, Sep 23 2011. ISSN 0959-535X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295323500003 >.

WARNER, D. S.; SHENG, H. X.; BATINIC-HABERLE, I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 18, p. 3221-3231, Aug 2004. ISSN 0022-0949. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224132000015 >.

WEINRAUCH, V. et al. Beneficial effect of mild hypothermia and detrimental effect of deep hypothermia after cardiac-arrest in dogs. **Stroke**, v. 23, n. 10, p. 1454-1462, Oct 1992. ISSN 0039-2499. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992JQ01800011 >.

WEVER, K. E. et al. Determinants of the efficacy of cardiac ischemic preconditioning: a systematic review and meta-analysis of animal studies. **Plos One**, v. 10, n. 11, Nov 18 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000365154600031 >.

XIAO, G. et al. Safety profile and outcome of mild therapeutic hypothermia in patients following cardiac arrest: systematic review and meta-analysis. **Emergency Medicine Journal**, v. 30, n. 2, p. 91-100, Feb 2013. ISSN 1472-0205. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000314056100003 >.

XIONG, M. et al. Post-ischemic hypothermia for 24 h in P7 rats rescues hippocampal neuron: Association with decreased astrocyte activation and inflammatory cytokine expression. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 351-357, Aug 14 2009. ISSN 0361-9230. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000268614400003 >.

XU, K. et al. Mitochondrial dysfunction in aging rat brain following transient global ischemia. **Oxygen Transport to Tissue Xxix**, v. 614, p. 379-386, 2008. ISSN 0065-2598. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253182800042 >.

YEH, C.-H. et al. Carvedilol treatment after myocardial infarct decreases cardiomyocytic apoptosis in the peri-infarct zone during cardioplegia-induced cardiac arrest. **Shock**, v. 39, n. 4, p. 343-352, Apr 2013. ISSN 1073-2322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316335600004 >.

YUAN, H.-J. et al. Noninvasive delayed limb ischemic preconditioning in rats increases antioxidant activities in cerebral tissue during severe ischemia-reperfusion injury. **Journal of Surgical Research**, v. 174, n. 1, p. 176-183, May 2012. ISSN 0022-4804. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000302123300033 >.

YUCEL, H. et al. Association between oxidative stress index and post-CPR early mortality in cardiac arrest patients: A prospective observational study. **Anatolian Journal of Cardiology**, v. 15, n. 9, p. 737-743, Sep 2015. ISSN 2149-2263. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000361689900007 >.

ZEINER, A. et al. Hyperthermia after cardiac arrest is associated with an unfavorable neurologic outcome. **Archives of Internal Medicine**, v. 161, n. 16, p. 2007-2012, Sep 10 2001. ISSN 0003-9926. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000170816200007 >.

ZHANG, M.-Y. et al. Shen-Fu injection attenuates postresuscitation lung injury in a porcine model of cardiac arrest. **Resuscitation**, v. 83, n. 9, p. 1152-1158, Sep 2012. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000309048600027 >.

ZHANG, X. W. et al. The effect of mild induced hypothermia on outcomes of patients after cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Critical Care**, v. 19, Dec 1 2015. ISSN 1466-609X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000365502200001 >.

ZHANG, Y.; HU, S.; CHEN, Y. Hepatocyte growth factor suppresses hypoxia/reoxygenation-induced XO activation in cardiac microvascular endothelial cells. **Heart and Vessels**, v. 30, n. 4, p. 534-544, Jul 2015. ISSN 0910-8327. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000358737900015 >.

ZHANG, Y.-S. et al. A novel function of nuclear nonmuscle myosin regulatory light chain in promotion of xanthine oxidase transcription after myocardial ischemia/reperfusion. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 83, p. 115-128, Jun 2015. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000355577600011 >.

ZHU, Z. et al. All-trans retinoic acid ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury by reducing cardiomyocyte apoptosis. **Plos One**, v. 10, n. 7, Jul 17 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000358198700135 >.

ZWEIER, J. L.; KUPPUSAMY, P.; LUTTY, G. A. Measurement of endothelial-cell free-radical generation - evidence for a central mechanism of free-radical injury in postischemic tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 11, p. 4046-4050, Jun 1988. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988N799900082 >.

11. CURRICULUM VITAE

Fernanda Schäfer Hackenhaar



Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/1355876204955453>

Última atualização do currículo em 09/2015

Resumo informado pelo autor

Atualmente é doutoranda do PPGBCM-UFRGS, estudando estresse oxidativo pós-parada cardiorrespiratória e hipotermia terapêutica. Realizou um período de doutorado sanduíche no Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, em Milão-Itália, onde estudou modelos animais de parada cardiorrespiratória e infarto do miocárdio. Tem experiência na área de biologia celular, com ênfase em estresse oxidativo, envelhecimento, aterosclerose e parada cardiorrespiratória. Mestre em Biologia celular e molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM-UFRGS) em 2011, estudando a associação entre aterosclerose e apneia obstrutiva do sono. Bióloga pela UFRGS em 2009.

Formação acadêmica/titulação

- **Doutoranda** em Biologia Celular e Molecular, de março de 2012 o presente momento.

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular- PPGBCM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Orientadora: Mara da Silveira Benfato

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Período sanduíche de dezembro de 2013 a maio de 2014.

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri – Milão-Itália.

Orientador : Giuseppe Ristagno

Bolsista do: Ciência Sem Fronteiras

- **Mestrado** em Biologia Celular e Molecular, de março de 2009 a março de 2011.

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular- PPGBCM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Orientadora: Mara da Silveira Benfato

Título: Estresse oxidativo e hormônios esteróides na associação entre apnéias-hipopnéias obstrutivas do sono e doença aterosclerótica coronariana.

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

- **Graduação** em Ciências Biológicas, de 2004 a 2008.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Artigos completos publicados em periódicos

1. Behling C.S., Andrade A., Putti J, Mahl C. D., Hackenhaar F. S., Silva A.C.A., Silva M. N.C., Salomon T.B., Santos C.E.I., Dias J. F., Benfato M.S.

Treatment of oxidative stress in brain of ovariectomized rats with omega-3 and lipoic acid.

Molecular Nutrition & Food Research, v. 59, p. 2547-2555, 2015.

2. Mahl C.D., Behling C.S., Hackenhaar F.S., Silva M.C., Putti J., Salomon T.B., Alves S.H., Fuentefria A., Benfato M.S.

Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 82, p. 203-208, 2015.

3. Hackenhaar F.S., Martinez D., Klein C., Medeiros T.M., Alabarse P.V.G., Wainstein M.V., Gonçalves S.C., Benfato M.S.

Serum ferritin levels may have a pro-atherosclerotic role in coronary artery disease patients with sleep disordered breathing.

Journal of Applied Biomedicine, v. 13 p. 289-298, 2015.

4. Verona C., Hackenhaar F.S., Teixeira C., Medeiros T.M.M., Alabarse P.V.G., Salomon T.B., Shüller A.K., Maccari J.G., Condessa R.L., Oliveira R.P., S.R.R. Vieira, Benfato M.S.

Blood markers of oxidative stress predict weaning failure from mechanical ventilation

Journal of Cellular and Molecular Medicine, v. 19, p. 1253-1261, 2015.

5. Hackenhaar F.S., Fumagalli F., Li Volti G., Sorrenti V., Russo I., Staszewsky L., Masson S., Latini R., Ristagno G.

Relationship between post-cardiac arrest myocardial oxidative stress and myocardial dysfunction in the rat.

Journal of Biomedical Science, v. 21, p. 1-9, 2014.

6. Andrade A., Salomon T.B., Behling C.S., Hackenhaar, F.S., Putti J., Mahl, C.D., Benfato M.S.

Alpha-lipoic acid restores tear production in an animal model of dry eye.

Experimental Eye Research, v. 120, p. 1-9, 2014.

7. Abegg M.A., Mendes M.F.A., Hackenhaar F.S., Medeiros T.M., Schüller, A.K., Alabarse P.V.G., Salomon T.B., ; Benfato, M.S.

In vitro response of clinical isolates of *Candida* species to oxidative stress.

Revista Brasileira de Biociências, v. 12, p. 1-8, 2014.

8. Silva A.C.A., Tiago B.S., Behling C.S., Putti J., Hackenhaar F.S., Alabarse P.V.G., Schüller A.K., Benfato M.S.

Oxidative stress in the kidney of reproductive female rats during aging.

Biogerontology, v. 14, p. 411-422, 2013.

9. Salomon T.B., Hackenhaar F.S., Almeida A.C., Schüller A.K., Alabarse P.V.G., Ehrenbrink G., Benfato M.S.

Oxidative stress in testis of animals during aging with and without reproductive activity. Experimental Gerontology, v. 48, p. 940-946, 2013.

10. Hackenhaar F.S., Martinez D., Medeiros T.M., Klein C., Alabarse P.V.G., Wainstein M.V., Goncalves S.C., Benfato M.S.

Oxidized-LDL and paraoxonase-1 as biomarkers of coronary artery disease in patients with sleep-disordered breathing.

Current Medicinal Chemistry, v. 19, p. 4359-4366, 2012.

11. de Souza Fantin, S., Wainstein M.V., Polanczyk C.A., Ledur P., Lazzari C.M., Klein C., Hackenhaar F.S., Benfato M., Schaan B.D.

Inflammatory and oxidative stress markers after intravenous insulin in percutaneous coronary intervention with stent in type 2 Diabetes Mellitus: a randomized controlled trial.

The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 96, p. 478-485, 2011.

12. Alabarse P.V.G., Hackenhaar F.S., Medeiros T.M., Mendes M.F.A, Viacava P.R., Schüller A.K., Salomon T.B., Ehrenbrink G., Benfato M.S.

Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging.

Experimental Gerontology, v. 46, p. 241-248, 2011.

13. Alabarse P.V.G., Salomon T.B., Medeiros T.M., Hackenhaar F.S., Schüller A.K., Ehrenbrink G., Benfato M.S.

Oxidative stress in the kidney reproductive male rats during aging.

Experimental Gerontology, v. 46, p. 773-780, 2011.

14. Abegg M.A., Alabarse P.V.G., Casanova A., Hoscheid J., Salomon T.B., Hackenhaar F.S., Medeiros T.M., Benfato M.S.

Response to oxidative stress in eight pathogenic yeast species of the genus *Candida*.

Mycopathologia (1975. Print), v. 170, p. 11-20, 2010.

15. Klein C., Martinez D., Hackenhaar F.S., Medeiros T.M., Marcolin M.L., Silveira F.S., Wainstein M.V., Gonçalves S.C., Benfato M.S.

Carbonyl groups: Bridging the gap between sleep disordered breathing and coronary artery disease.

Free Radical Research, v. 44, p. 907-912, 2010.

16. Hackenhaar F.S., Salomon T.B., Alabarse P.V.G., Ehrenbrink G., Benfato M.S. Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes.

Cell Biochemistry and Function, v. 27, p. 378-382, 2009.

17. Ehrenbrink G., Hackenhaar F.S., Salomon T.B., Petrucci A., Sandri M., Benfato M.S. Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes.

Experimental Gerontology, v. 41, n. 4, p. 368-371, 2006

Revisão de periódico

Journal of Cellular and Molecular Medicine

Apresentações em congressos

Hackenhaar, F.S.; Medeiros, T.M.; Behling, C.S.; Putti, J.; Mahl, C.D.; Verona, C.; Silva, A.C.A.; Oliveira, V.M.; Vieira, S.R.R.; Benfato, M.S. Oxidative stress in post-cardiac resuscitation syndrome after mild hypothermia. In: VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013, Buenos Aires, Argentina. VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013.

Hackenhaar, FS.; Martinez, D.; Medeiros, T.M.; Klein, C.; Alabarse, P.V.G. ; Benfato, M. S. Oxidized-LDL and Paraoxonase-1 in the Association between Coronary Artery Disease in Sleep-Disordered Breathing. In: International Congress on Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro, Brasil. 10th International Congress on Cell Biology. Rio de Janeiro, RJ, 2012. p. 108-108.

Hackenhaar, F.S.; Klein, C.; Suris, F.M.; Medeiros, T.M.; Martinez, D.; Benfato, M.S. Enzymatic antioxidant defenses in the association of coronary artery disease and obstructive sleep apnea syndrome. In: Free Radicals and Antioxidants, 2009, Santiago, Chile. Free Radicals and Antioxidants in Chile. Santiago: Salviat Impresores, 2009. p. 136-136.

Hackenhaar, F. S.; Salomon, T.B.; Alabarse, P.V.G.; Benfato, M.S. Antioxidant enzymes activities in kidney of naïve and experienced male rats. In: XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB, 2008, Águas de Lindóia, Brasil. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting - 2008, 2008. p. 122-122.

Hackenhaar, F. S.; Alabarse, P. V. G.; Salomon, Tiago B.; Benfato, M.S. Pulmonary activities of antioxidant enzymes and protein damage in naive and experienced male rats. In: V Meeting of SFRBM-South American Group : Free Radicals in Montevideo, 2007, Montevideo, Uruguai. Free Radicals in Montevideo 2007. Montevideo: Imprensa Gega s. r. l., 2007. p. 59-59.

Produção de websites didáticos

Benfato, M.S., Salomon, T.B., Hackenhaar, F. S., Alabarse, P.V.G., Marcolin, M. L.
Controle do pH em Mamíferos, 2008.

Hackenhaar, F. S., Alabarse, P. V. G., Salomon, Tiago B, Benfato, M.S.

Dano oxidativo no DNA, 2007.

Alabarse, P. V. G., Salomon, Tiago B, Hackenhaar, F. S., Benfato, Mara da Silveira

Replicação de DNA, 2006.